

ATP-sensitive Kaliumkanäle in Kapillarfragmenten aus dem Herzen des Meerschweinchens

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Mederos y Schnitzler
aus Düsseldorf

Marburg/Lahn 2001

Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation amangenommen.

Erstgutachter Prof. Dr. Uwe Homberg
Zweitgutachter Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut
Tag der mündlichen Prüfung am

Erklärung

Ich versichere, daß ich meine Dissertation

„ATP-sensitive Kaliumkanäle in Kapillarfragmenten aus dem Herzen des Meerschweinchens“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Endothelfunktionen	1
Beschreibung des K_{ATP} -Kanals	2
Struktur der α -Untereinheit	4
Struktur der β -Untereinheit	7
Kombinationen	10
Eigenschaften	11
Vorkommen	13
K_{ATP} -Kanäle im Herzen	15
Material und Methoden	18
Präparation der Herzkapillaren	18
Elektrophysiologie	21
Konventionelle Ganzzelleableitung	22
Perforated-Patch-Methode	25
Offsetpotential	27
Liquid-Junction-Potential	28
Mikromanipulator	29
Unterbau	30
Sealbildung	31
Referenzelektrode	31
Pipettenhalter und Rauschen	33
Perfusionssystem	34
Meßkammer	36
Pipettenkapazität	37
Membrankapazitäts-Bestimmung	37
Lucifer Yellow-Anfärbung	38
Zusammensetzung der Salzlösung	39
Pharmaka und Salze	39
Ergebnisse	40
Passive elektrische Eigenschaften	40
K_{ATP} -Strom	44
Diskussion	52
Kapazitätsmessung	52
Strom-Spannungs-Beziehung	53
K_{ATP} -Strom	53
Mögliche Funktion der K_{ATP} -Kanäle im Kapillarendothel	57
Zusammenfassung	58
Literatur	59
Eigene Veröffentlichungen	70
Danksagung	71

Einleitung

Endothelfunktionen

Das Endothel ist eine homogene, konfluente Schicht von sehr dünnen Zellen (0,3 – 0,6 μm dick), die die innere Auskleidung aller Blutgefäße bilden. Diese Auskleidung trennt das Blut mit seinen Bestandteilen vom umliegenden Gewebe. Die Kapillaren als die feinsten Blutgefäße bestehen ausschließlich aus hintereinander geschalteten Endothelzellen, die das Lumen röhrenförmig umgreifen und so den Raum für das Blut bilden. Alle Endothelzellen besitzen eine spezielle Oberfläche, damit sich die Blutkörperchen nicht anheften können. Damit gewährleisten sie einen ungehinderten Blutfluß. Neben dieser Eigenschaft besitzt das Endothel die sogenannte Barrierefunktion, die dazu führt, daß die interstitielle Flüssigkeit eine andere Zusammensetzung hat als das Blut. Das Endothel ist für große Moleküle relativ impermeabel (größer als 10 nm im Moleküldurchmesser). Dieses endotheliale Molekülsieb ist die Ursache für den kolloidosmotischen Druck, der die Flüssigkeitsbewegungen zwischen dem Kapillarlumen und dem interstitiellen Raum entscheidend beeinflusst.

Täglich werden beim Menschen unter Normalbedingungen in den Kapillaren ca. 20 Liter Flüssigkeit durch den transmuralen Druck abgepreßt und ca. 18 Liter durch den kolloidosmotischen Druck wieder an der venösen Seite aufgenommen, so daß ein Netto-Flüssigkeitsaustritt von zwei Litern vorliegt, der die tägliche Lymphproduktion darstellt. Diese hydraulischen Flüssigkeitsbewegungen finden fast ausschließlich zwischen den Endothelzellen statt, und zwar über die Interzellularspalten, die durch Unterbrechungen der Schlußleisten gebildet werden. Die Interzellularspalten betragen weit weniger als ein Promille der Oberfläche der Kapillaren, und doch geht über 90% des Flüssigkeitsaustritts über diesen parazellulären Weg. Das Endothel selbst bestimmt die Größe des Flüssigkeitsaustritts, es regelt die Kapillarpermeabilität. Neben dieser Funktion ist das Endothel mit 1,5 kg das größte endokrine Organ. Durch Sekretion von lokal wirkenden Substanzen (Autacoide) beeinflusst es den Organismus.

Die beiden Hauptfunktionen des Endothels, die Freisetzung vasoaktiver Substanzen und die Regulation der Kapillarpermeabilität, werden beeinflusst durch die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration (He et al., 1996). Obwohl Endothelzellen nicht zu den erregbaren Zellen wie Nerven und Muskelzellen gehören, trägt ihre elektrische Aktivität zu diesen Funktionen bei. Cannell & Sage (1989) fanden eine enge Kopplung zwischen freier intrazellulärer Kalziumkonzentration und Membranpotential. Oszillationen in der Konzentration des freien intrazellulären Kalziums konnten beobachtet werden (Jacob, 1991; Usachev et al.,

1995; Langheinrich et al., 1998), die mit Oszillationen des Membranpotentials einhergehen (Usachev et al., 1995). Zudem zeigt das Endothel bei Applikation von vasoaktiven Stoffen ein sich veränderndes Membranpotential (Mehrke & Daut, 1990; Marchenko & Sage, 1993; McGahren et al., 1998; Frieden et al., 1999). Die Membranpotentialveränderung kann als Sensor wie als Effektor für die Endothelfunktionen aufgefaßt werden. Um mehr über die elektrische Aktivität von Endothelzellen zu verstehen, müßte deren Kanalausstattung geklärt sein. Leider ist man bisher weit davon entfernt, diese zu erfassen.

In der vorliegenden Arbeit habe ich mich auf den ATP-sensitiven Kaliumkanal in mikrovasikulärem Endothel, das frisch als Kapillarfragment (siehe Abbildung 1.1) aus dem Meerschweinchen-Herzen gewonnen wurde, konzentriert. Hauptsächlich habe ich dabei elektrophysiologische Untersuchungen vorgenommen.

Beschreibung des K_{ATP} -Kanals

Erst durch die Entwicklung der Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) konnten Ionenkanäle besser charakterisiert werden. Die Entdeckung des ATP-sensitiven Kaliumkanals (K_{ATP} -Kanals) gelang mittels dieser Technik. Akinori Noma (1983) in Japan gilt als Erstbeschreiber – er identifizierte ihn in Herzmuskelzellen. Ein Jahr später konnten Cook und Hales (1984) ihn in den Vereinigten Staaten in β -Zellen des Pankreas nachweisen. Gerd Trube und Jürgen Hescheler (1984) in Deutschland identifizierten den K_{ATP} -Kanal ebenfalls in Herzmuskelzellen – sie sind sogar genau genommen die Erstbeschreiber mit dem ‚Abstract‘ von 1983: „Potassium channels in isolated patches of cardiac cell membrane“ in Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 322, R64.

Der ATP-sensitive Kaliumkanal besteht aus acht Untereinheiten, das heißt aus acht einzelnen Proteinen (Shyng & Nichols, 1997; Clement et al., 1997). Die 4 Untereinheiten, die gemeinsam die Kanalpore bilden, werden als α -Untereinheiten bezeichnet und gehören zu der Familie der Kalium-einwärtsgerichtenden Proteine, die aus zwei Mitgliedern besteht: Kir6.1 (Inagaki et al., 1995b, 1995c) und Kir6.2 (Inagaki et al., 1995a).

Die vier β -Untereinheiten gehören zur Gruppe der ABC-Transporter (Higgins, 1992) und werden aufgrund ihrer Sulfonylharnstoff-Affinität als Sulfonylharnstoffrezeptoren (SUR) bezeichnet. Es gibt folgende drei SUR: SUR1 (Aguilar-Bryan et al., 1995), SUR2A (Inagaki et al., 1996) und SUR2B (Isomoto et al., 1996), wobei die letzten beiden Splicevarianten sind, bei denen sich das letzte translatierte Exon unterscheidet (bei SUR2A Exon 38 und bei SUR2B Exon 39).

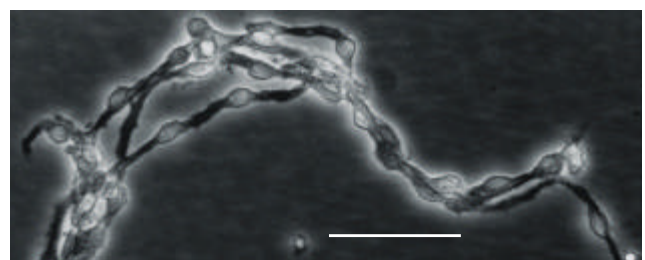
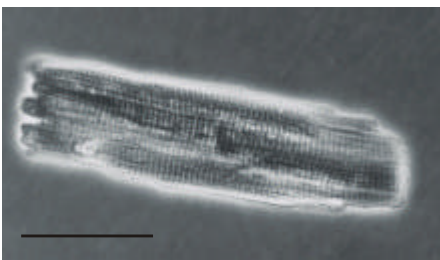
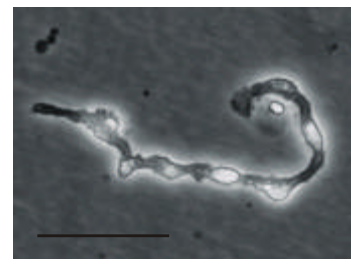
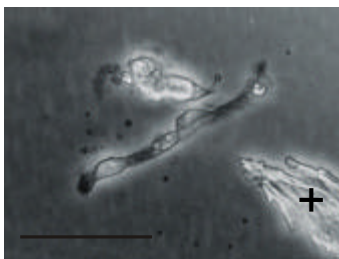
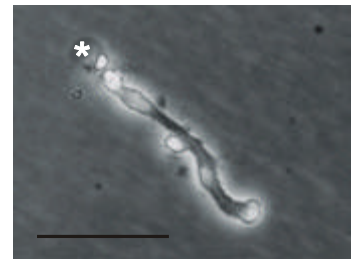
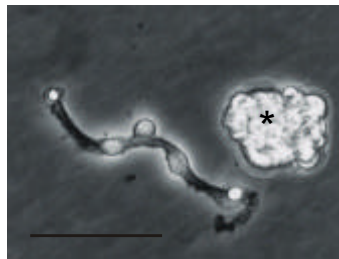
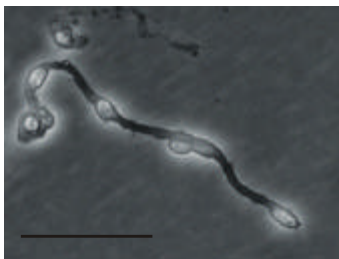
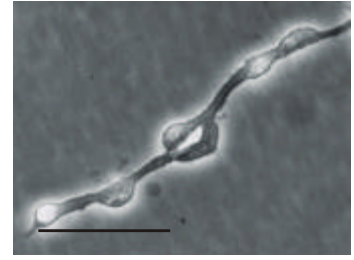
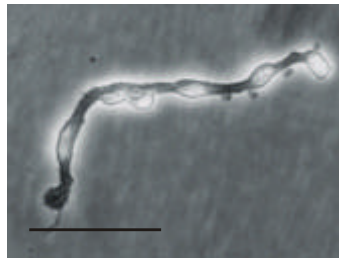
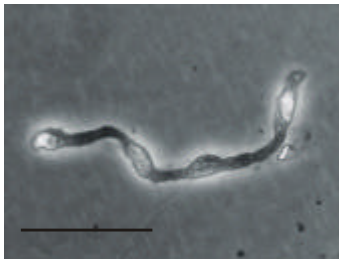
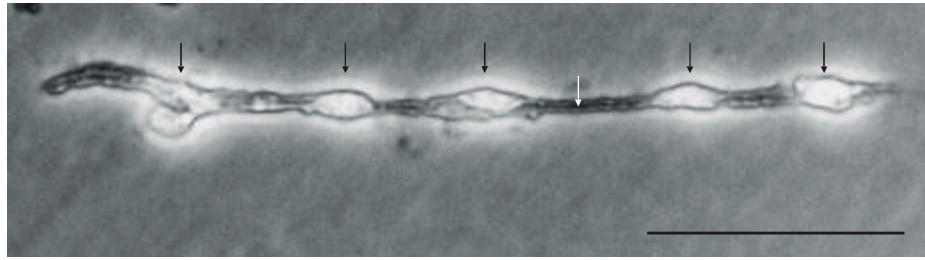


Abbildung 1.1

Kapillarfragmente aus dem Herzen vom Meerschweinchen

Oberste Abbildung zeigt ein 5-zelliges Kapillarfragment. Die schwarzen Pfeile geben die Kernbereiche an. Der weiße Pfeil weist auf das kollabierte Lumen, als schwarze Linie sichtbar, hin. Die darunter befindlichen 9 Abbildungen zeigen Kapillarfragmente, die gemessen worden sind. Der schwarze Stern zeigt eine total kollabierte

Herzmuskelzelle. Der weiße Stern zeigt eine Membranausstülpung. Das schwarze Kreuz weist auf eine sich kollabierende Herzmuskelzelle hin. Links unten ist eine isolierte Herzmuskelzelle, rechts unten ein Kapillarnetz, abgebildet. Maßbalken: 50µm

Der K_{ATP} -Kanal ist also ein Hetero-Octamer (siehe Abbildung 1.2). Die Bezeichnungen α - und β -Untereinheit beim K_{ATP} -Kanal hat nicht die gleiche Bedeutung wie zum Beispiel bei spannungsabhängigen Natrium- und Kaliumkanälen, bei denen die β -Untereinheit eine akzesorische Komponente ist, sondern die β -Untereinheit ist notwendig für einen funktionellen K_{ATP} -Kanal. Die α -Untereinheiten lassen sich nicht allein exprimieren und bilden keinen funktionellen Kanal (außer siehe: Tucker et al., 1997).

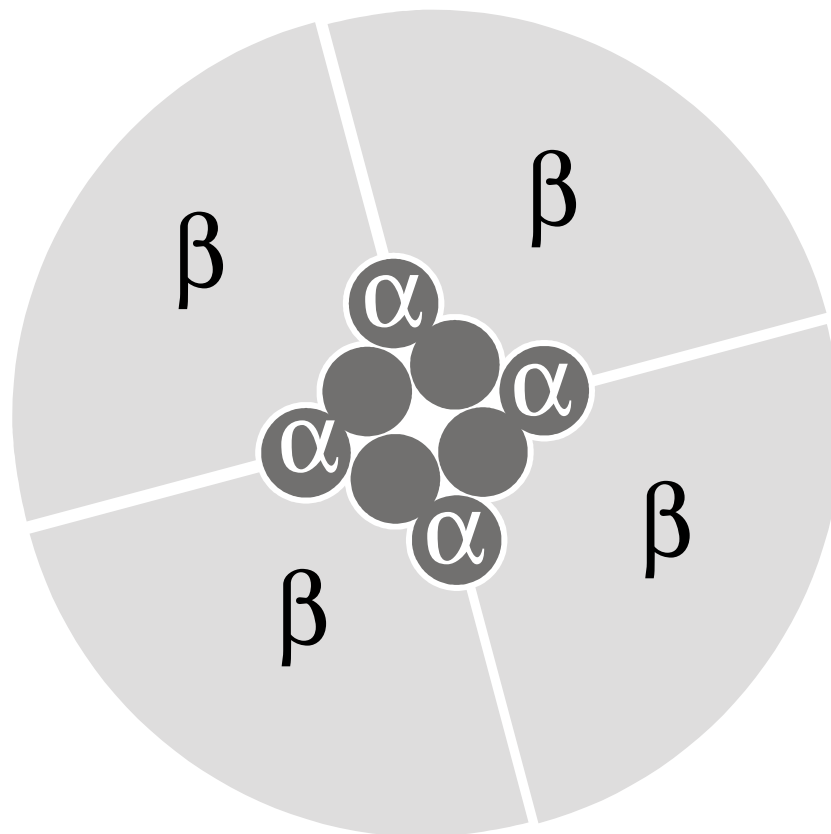


Abbildung 1.2

Schematischer Aufbau des K_{ATP} -Kanals

Der K_{ATP} -Kanal ist ein Hetero-Octamer aus vier α -Untereinheiten und vier β -Untereinheiten. Die α -Untereinheiten sind als Doppelkreise zu erkennen, die die zwei transmembranären Domänen darstellen. Sie bilden gemeinsam die Pore. Die vier Viertelkreise stellen die β -Untereinheiten dar. Ihre Größe repräsentiert die jeweils 17 transmembranären Domänen. Zwei α -Untereinheiten sind bekannt: Kir6.1 und Kir6.2. Drei β -Untereinheiten existieren: SUR1, SUR2A, SUR2B

Struktur der α -Untereinheit

Die α -Untereinheiten Kir6.1 und Kir6.2 bestehen aus zwei transmembranären Domänen oder Helices, zwischen denen sich der porenbildende Bereich befindet. Die Amino- und Carboxyenden liegen intrazellulär (siehe Abbildung 1.3). Das Carboxyende ist deutlich länger als das Aminoende. Die zwei kurzen extrazellulären Schleifen weisen keine Glykosylierung auf.

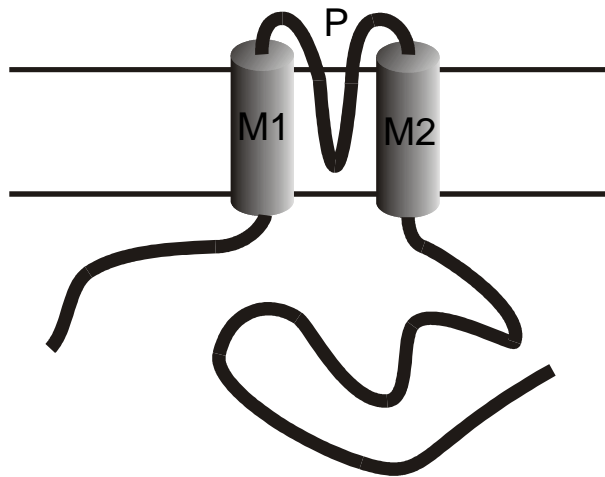


Abbildung 1.3

Schematische Darstellung der α -Untereinheit

Die Aminosäuresequenz ist als schwarze Linie dargestellt. Links ist das Aminoende und rechts das Carboxyende. Beide befinden sich intrazellulär. Die beiden grauen Zylinder repräsentieren die transmembranären Domänen (M1 und M2). Die beiden kurzen extrazellulären Bereiche gehen in die Porenregion (P) über. Das cytoplasmatische Carboxyende ist deutlich länger als das Aminoende. Die beiden horizontalen Striche symbolisieren den ‚lipid-bilayer‘.

Beim Meerschweinchen besteht der Kir6.1 aus 424 Aminosäuren und der Kir6.2 aus 390 Aminosäuren. Bezüglich der Aminosäuresequenz sind Kir6.1 und Kir6.2 des Meerschweinchens zu 98,6% und zu 96,2% mit den menschlichen Homologen identisch (siehe Abbildung 1.4).

Die Porenregion der α -Untereinheiten, als „H5-Segment“ bezeichnet, besitzt die konservierte Aminosäuresequenz Threonin-Isoleucin-Glycin-Phenylalanin-Glycin (TIGFG). Dieses Motiv ist für die Kaliumselektivität verantwortlich (Jan & Jan, 1994). Die spannungsabhängigen Kaliumkanäle haben das Motiv Threonin-Isoleucin-Glycin-Tyrosin-Glycin (TIGYG), aber der Unterschied in der vorletzten Aminosäure, Phenylalanin statt Tyrosin, ist

bezogen auf den Kaliumselektivitätsfilter gering. Interessant hierbei ist, daß bei einigen Tandem-Kaliumkanälen (siehe z. B. Rajan et al., 2000) beide Motive vorhanden und konserviert sind – in der ersten Pore das TIGYG und in der zweiten TIGFG.

```

gpKir6.1 1 MLARKSIIPEEYVLARIAAENVRKPRIRDRLPKARFIAKSGACNLAHKNIREQGRFLQDI 60
:
:
hKir6.1 1 MLARKSIIPEEYVLARIAAENLRKPRIRDRLPKARFIAKSGACNLAHKNIREQGRFLQDI 60
:
:
TM1
gpKir6.1 61 FTTLVDLKWHRHLVIFTMSFLCSWLLFAMWWLVAFAGDIYAYMEKSGLEKSALESTVC 120
:
:
hKir6.1 61 FTTLVDLKWHRHLVIFTMSFLCSWLLFAMWWLVAFAGDIYAYMEKSGMEKSGLESTVC 120
:
:
H5 TM2
gpKir6.1 121 VTNVRSFTSAFLFSIEVQVTIGFGGRMMTEECPLAITVLLIQNIVGLIINAVMLGCIIFMK 180
:
:
hKir6.1 121 VTNVRSFTSAFLFSIEVQVTIGFGGRMMTEECPLAITVLLIQNIVGLIINAVMLGCIIFMK 180
:
:
gpKir6.1 181 TAQAHRRAETLIFSRHAVIAVRNGKLCFMRVGDRLRKSMIISASVRIQVVKTTTPEGEV 240
:
:
hKir6.1 181 TAQAHRRAETLIFSRHAVIAVRNGKLCFMRVGDRLRKSMIISASVRIQVVKTTTPEGEV 240
:
:
gpKir6.1 241 VPIHQLDIPVDNPIESNNIFLVAPLIICHVIDKRSPLYDISATDLANQDLEIVIVILEGVV 300
:
:
hKir6.1 241 VPIHQLDIPVDNPIESNNIFLVAPLIICHVIDKRSPLYDISATDLANQDLEIVIVILEGVV 300
:
:
gpKir6.1 301 ETTGITTQARTSYIAEEIQWGHFRFVSIVTEEEGVYSDYKFGNTVKVAAPRCSARELDE 360
:
:
hKir6.1 301 ETTGITTQARTSYIAEEIQWGHFRFVSIVTEEEGVYSDYKFGNTVKVAAPRCSARELDE 360
:
:
gpKir6.1 361 KPSILIQTLQKSELSSHQNSLRKNSMRRNNSMRRNNSIRRNNSSLIIVPKVQFMTLEGNQN 420
:
:
hKir6.1 361 KPSILIQTLQKSELSSHQNSLRKNSMRRNNSMRRNNSIRRNNSSLMVPKVQFMTPEGNQN 420
:
:
gpKir6.1 421 TLES 424
:
:
hKir6.1 421 TSES 424
:
:
gpKir6.2 1 MLSRKGIPEEYVLRLAEDPTEPRYRARERRARFVSKKGNVVAHKNIREQGRFLQDVF 60
:
:
hKir6.2 1 MLSRKGIPEEYVLRLAEDPAEPRYRARQRRARFVSKKGNVVAHKNIREQGRFLQDVF 60
:
:
TM1
gpKir6.2 61 TTLVDLKWPHHTLLIFTMSFLCSWLLFAMVWVLI AFAGDLAPGEGTTVPCVTSIHSFSSA 120
:
:
hKir6.2 61 TTLVDLKWPHHTLLIFTMSFLCSWLLFAMVWVLI AFAGDLAPSEGTAEPVTSIHSFSSA 120
:
:
H5 TM2
gpKir6.2 121 FLFSIEVQVTIGFGGRMVTEECPLAILLIVQIVGLMINAIMLGCIIFMKTSQAHRRAET 180
:
:
hKir6.2 121 FLFSIEVQVTIGFGGRMVTEECPLAILLIVQIVGLMINAIMLGCIIFMKTAQHRRAET 180
:
:
gpKir6.2 181 LIFS KHAVIALRHGRCLFMRVGDRLRKSMIISATIHMVVRKTTSPGEVVLHQVDIPM 240
:
:
hKir6.2 181 LIFS KHAVIALRHGRCLFMRVGDRLRKSMIISATIHMVVRKTTSPGEVVLHQVDIPM 240
:
:
gpKir6.2 241 ENGVGNSIFLVAPLI IYHVIDANSPLYDLGPSDLHHHQDLEIIVILEGVVETTGITTA 300
:
:
hKir6.2 241 ENGVGNSIFLVAPLI IYHVIDANSPLYDLGPSDLHHHQDLEIIVILEGVVETTGITTA 300
:
:
gpKir6.2 301 RTSYLADEILWGHFRFVPIVAEEDGRYSVDYKFGNTIKVPTPLCTAHQLEDHSLLDALT 360
:
:
hKir6.2 301 RTSYLADEILWGRQRFVPIVAEEDGRYSVDYKFGNTIKVPTPLCTARQLDEDHSLLEALT 360
:
:
gpKir6.2 361 LASTRGPLRKRSPVAKAKPRFSISPDSLS 390
:
:
hKir6.2 361 LASARGPLRKRSPVMAKAKPKFSISPDSLS 390

```

Abbildung 1.4

Vergleich der Kir-Aminosäuresequenzen des Meerschweinchens mit den entsprechenden des Menschen

Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code dargestellt. Grau eingefärbt sind die transmembranären Domänen (TM1 und TM2). Schwarz eingefärbt die Porenregion, als H5 bezeichnet. Der Kaliumselektivitätsfilter ist kursiv gedruckt. Kir6.1 hat 424 Aminosäuren und Kir6.2 390. Zwischen den beiden Sequenzen befinden sich

folgende Symbole: ‚+‘ für biophysikalisch ähnliche Aminosäure, ‚:‘ für gleiche Aminosäure, und ‚/‘ für ungleiche Aminosäure. Kir6.1 und Kir 6.2 des Meerschweinchens sind zu 98,6% und zu 96,2% mit den menschlichen identisch.

Struktur der β -Untereinheit

Die drei Sulfonylharnstoffrezeptoren sind aus mehr als 1500 Aminosäuren bestehende integrale Membranproteine und damit fast viermal so lang wie die α -Untereinheit. Alle SUR weisen 17 transmembranäre Domänen auf (Tusnády et al., 1997). Die ersten elf Helices liegen zwischen dem extrazellulären Aminoende und der ersten Nukleotidbindungstasche, die sich intrazellulär befindet. Das Aminoende weist eine Glykosylierung bei SUR1 an der Position zehn und bei den SUR2-Varianten an der Position acht oder neun auf. Eine weitere glykosylierte Aminosäure befindet sich nach der 12. transmembranären Domäne. Das intrazelluläre Carboxyende nach der 17. transmembranären Helix besitzt eine zweite Nukleotidbindungstasche (siehe Abbildung 1.5).

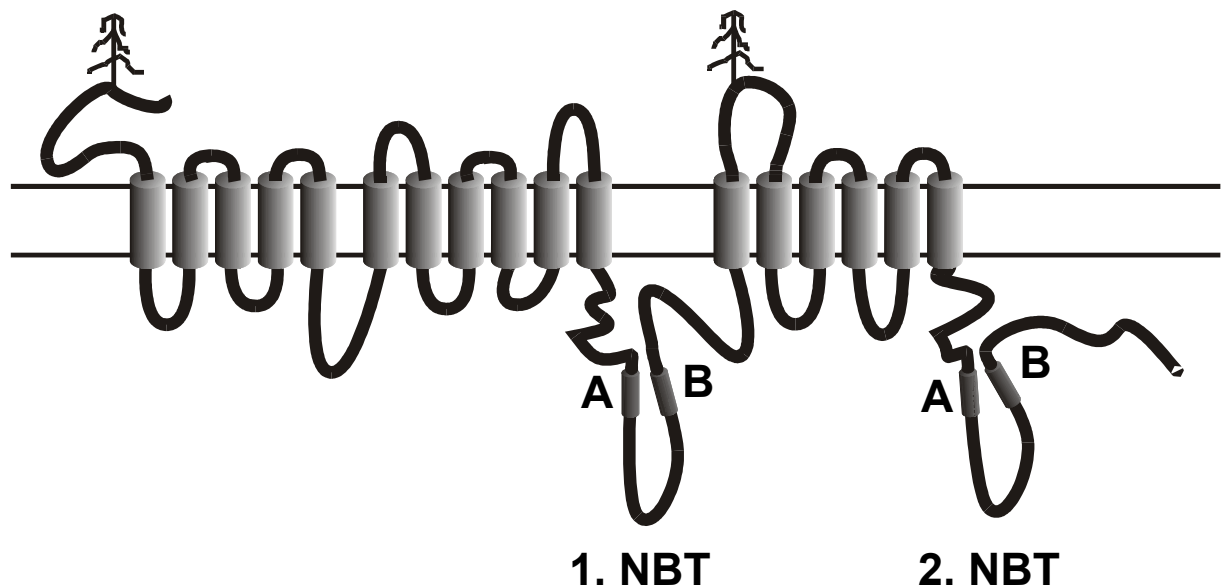


Abbildung 1.5

Schematische Darstellung der β -Untereinheit

Die Aminosäuresequenz ist als schwarze Linie dargestellt. Links ist das Aminoende, das extrazellulär liegt und eine Glykosylierung aufweist, die als tote Fichte symbolisiert ist. Rechts liegt das Carboxyende intrazellulär. Die grauen Zylinder repräsentieren die transmembranären Domänen der Aminosäuresequenz – 17 an der Zahl. Eine zweite Glykosylierung findet sich nach der zwölften transmembranären Helix in der extrazellulären Schlaufe. Zwischen der elften und zwölften transmembranären Domäne befindet sich eine große intrazelluläre Schlaufe. Sie weist das Walker A (A) und Walker B (B) auf und stellt die erste Nukleotidbindungstasche (1. NBT) dar. Die

zweite Nukleotidbindungstasche (2. NBT) findet sich am Carboxyende. Die beiden horizontalen Striche symbolisieren den ‚lipid-bilayer‘.

Beide Taschen weisen die sogenannten Walker A- und Walker B-Motive auf (Walker et al., 1982). Das Walker A-Motiv lautet Glycin-X-X-Glycin-X-Glycin-Lysin-Serin/Threonin und das Walker B-Motiv hat die Sequenz Y-Y-Y-Y-Asparagin-säure, wobei X für eine beliebige Aminosäure und Y für eine hydrophobe Aminosäure steht. Zudem zeichnen sich die Nukleotidbindungstaschen noch zusätzlich durch eine konservierte Sequenz (Leucin-Serin-Glycin-Glycin-Glutamin) aus, die sich zwischen den beiden Walker-Motiven befindet (siehe Abbildung 1.6).

Walker A		Walker B					
hMRP1-NBD1	GQVGCCKS	LSGGQKQRVSLA	IYLFDF	678- 685	768- 779	788- 792	
hCFTR-NBD1	GSTGAGKT	LSGGQRARISLA	LYLLLD	458- 465	747- 758	768- 772	
hSUR1-NBD1	GQVGCCKS	LSGGQRQISVAR	VVFLDF	713- 720	829- 840	849- 853	
hSUR1-NBD2	GRTGSGKS	FSQGQRQLFCLA	IFIMDF	1378-1385	1481-1492	1501-1505	
hCFTR-NBD2	GRTGSGKS	LSHGKQLMCLA	ILLLDF	1244-1251	1346-1357	1366-1370	
hMRP1-NBD2	GRTGAGKS	LSVGQRQLVCLA	ILVLD	1327-1334	1430-1441	1450-1454	

Abbildung 1.6

Vergleich der Aminosäuresequenz innerhalb der Nukleotidbindungstaschen

Walker A und B sowie die konservierte Sequenz dazwischen sind charakteristisch für die Gruppe der ABC-Transporter. Die drei gewählten Mitglieder aus dem Menschen – das ATP-abhängige Arzneimittel-resistente Protein (*multidrug resistance proteine*, hMRP1), der cAMP-abhängige Chloridkanal (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, hCFTR) und der Sulfonylharnstoffrezeptor (*sulfonylurea receptor*, hSUR1) – haben eine ähnliche Domänenabfolge (hMRP1: 11 (5+6) TMD – NBD – 6 TMD – NBD, hCFTR: 6 TMD – NBD – 6 TMD – NBD, hSUR1: 11 TMD – NBD – 6 TMD – NBD). Bezüglich ihrer kompletten Aminosäuresequenz weisen die drei nur eine ca. 20%ige Identität auf, hingegen eine 30 bis 40%ige Identität in der Nukleotidbindungsdomäne. Innerhalb dieser Domäne befinden sich die aufgelisteten stark konservierten Motive. Auffällig hierbei ist, daß die zweite Nukleotidbindungsdomäne des Sulfonylharnstoffrezeptors (hSUR1-NBD2) sich von den anderen unterscheidet. Die mit Fettdruck hervorgehobenen Unterschiede verschlechtern wahrscheinlich die Nukleotidbindung. Das bedeutet, daß ein SUR-Protein im Gegensatz zu einem CFTR- und einem MRP1-Protein nur eine hoch affine ATP-Hydrolysestelle besitzt statt zwei (Ueda et al., 1999b).

(h: human Mensch *Homo sapiens*, TMD: *transmembranäre Domäne*, NBD: *Nukleotidbindungsdomäne*; die Aminosäuren sind als Ein-Buchstaben-Code dargestellt, rechts davon stehen die jeweiligen Sequenzabschnitte)

Obwohl beide Nukleotidbindungstaschen die drei Motive aufweisen, unterscheiden sich zum Beispiel die Eigenschaften in Nukleotid-Bindung und -Hydrolyse voneinander. Die erste Nukleotidbindungstasche ist hoch affin für ATP, aber hydrolysiert es nicht (oder kaum), während die zweite ATP hydrolysieren kann, aber nicht hoch affin ist (Ueda et al. 1997; Matsuo et al., 1999). Dafür kann die zweite Nukleotidbindungstasche MgADP direkt binden (Ueda et al., 1999a). Außerdem kooperieren beide miteinander. Das an der zweiten Nukleotidbindungstasche gebundene ADP stabilisiert das zuvor gebundene ATP in der ersten Nukleotidbindungstasche (Ueda et al., 1999a). Bei SUR2A und SUR2B hingegen kann die zweite Nukleotidbindungstasche Magnesium-unabhängig ATP binden hydrolysieren (Matsuo et al., 1999). Dies spiegelt sich in der Aminosäuresequenz der zweiten Nukleotidbindungstasche wider: Die Sequenz zwischen Walker A und B ist bei SUR1 Phenylalanin-Serin-Glutamin-Glycin-Glutamin und bei den SUR2 Phenylalanin-Serin-*Valin*-Glycin-Glutamin.

Zusammenfassend bedeutet das, daß die beiden Nukleotidbindungstaschen der SUR unterschiedliche Funktionen besitzen und nicht wie bei anderen ABC-Transportern funktionell gleichwertig sind (Senior et al., 1995). Abbildung 1.7 verdeutlicht die Unterschiede der bekannten SUR-Sequenzen.

gpSUR2A	AHRVSSITTDADLVLVFSEGI LVECDTGPNNLLTYRNGLFSTLVMTHK	AF183922
rSUR2A	AHRVSSIMDAGLVLVFSEGI LVECDTGPNNLLQHKNGLFSTLVMTNK	1501-1546
hSUR2A	AHRVSSIMDAGLVLVFSEGI LVECDTVPNNLFAHKNGPFSTLVMTNK	1503-1549
mSUR2A	AHRVSSIVDAGLVLVFSEGI LVECDTGPNNLLQHKNGLFSTLVMTNK	1501-1546
gpSUR2B	AHRVHTILTADLVIVMKRGNILEYDTPESLLAREDGIFASFVVRADM	AF183923
mSUR2B	AHRVHTILTADLVIVMKRGNILEYDTPESLLAQEDGVFASFVVRADM	1501-1546
hSUR2B	AHRVHTILTADLVIVMKRGNILEYDTPESLLAQENGVFASFVVRADM	1503-1549
hSUR1	AHRVHTILSADLMVVLKRGAILLEFDKPEKLLSRKDSVFASFVVRADK	1537-1581
rSUR1	AHRVHTILSADLMVVLKRGAILLEFDKPEKLLSQKDSVFASFVVRADK	1536-1581
maSUR1	AHRVHTILSADLMVVLKRGAILLEFDKPEKLLSQKDSVFASFVVRADK	1537-1582
ccSUR1	AHRVHTILSADLMVVLKRGAILLEFDKPEKLLSQKDSVFASFVVRADK	1537-1582
gpSUR1	AHRVHTILSADLMVVLKRGAILLEFDKPENLLSRKDSVFASFVVRADK	AF183921
dmSUR	AHRLTTILDYDRLTIVLDQGRIVEDGNPRELQOLEGVSVERGLLEKGAASKW	2124-2173

Abbildung 1.7

Vergleich der Aminosäuresequenz der Carboxyenden von verschiedenen Sulfonylharnstoffe

Von den Sulfonylharnstoffen der Säugetiere sind die letzten 46 Aminosäuren des Carboxyendes dargestellt. Bei der Fruchtfliege sind die letzten 49 Aminosäuren gezeigt. Die Rahmen und Kästchen dienen zum leichteren Vergleich der gleichen oder ungleichen Aminosäuren. SUR2A unterscheidet sich von SUR2B in den letzten 42 Aminosäuren, SUR1 von SUR2B in den letzten 37 Aminosäuren und der Fruchtfliegen-SUR von den SUR der Säugetiere in den letzten 43. Die Aminosäuresequenz von mSUR2A ist zu 98,4% identisch mit mSUR2B. Ein Unterschied in der Sequenz findet sich nur im dargestellten Carboxyende, der sich durch das mögliche Herausschneiden (alternative splicing) des Exon 38 begründet. Hingegen läßt sich der Unterschied zwischen SUR1 und

den SUR2-Varianten nicht nur auf das carboxyterminale Ende begrenzen. hSUR1 ist mit hSUR2B in der Aminosäuresequenz zu 67,9% identisch und rSUR1 mit rSUR2A zu 67,2%. Bezüglich der kompletten Sequenz ist hier die Divergenz kleiner als 1%. Jedoch zeigen die dargestellten Carboxyenden, daß SUR1 viel ähnlicher mit SUR2B ist als mit SUR2A. Beispielsweise gilt für die hier abgebildeten menschlichen Carboxyenden: hSUR1 ist mit hSUR2B zu 75,6% identisch und mit hSUR2A nur zu 37,0%. Die Divergenz beträgt also fast 39%.

Der Fruchtfliegen-SUR unterscheidet sich am deutlichsten von den anderen SUR. Der Vergleich mit der kompletten Sequenz ergibt für den hSUR1 eine Identität von 24,6%, für das Carboxyende des hSUR1 eine von 47,4%. Damit weisen die Carboxyenden der SUR-Proteine deutliche Unterschiede zueinander auf, die man benutzen kann, um Gen- und Art-spezifische „Primer“ zu entwickeln (Mederos y Schnitzler et al., 2000).

(gp: guinea pig Meerschweinchen *Cavia porcellus*, r: Norway rat Ratte *Rattus norvegicus*, h: human Mensch *Homo sapiens*, m: house mouse Maus *Mus musculus*, ma: golden hamster Goldhamster *Mesocricetus auratus*, cc: black-bellied hamster Feldhamster *Cricetus cricetus*, dm: fruit fly Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*)

Kombinationen

Prinzipiell sind sechs Kombinationen zwischen den verschiedenen α - und β -Untereinheiten möglich. Eine Vermischung der Mitglieder innerhalb der α - und β -Untereinheiten ist hierbei außer acht gelassen (siehe Tabelle).

Tabelle 1

	SUR1	SUR2A	SUR2B
Kir6.1	—	—	Glatte Muskulatur *
Kir6.2	Pankreas & Gehirn	Herz- & Skelettmuskel	Glatte Muskulatur

— bisher nicht kombinierbar

* diese Kombination auf RNA-Ebene in allen Organen

Die Tabelle zeigt, daß bisher 4 Kombinationsmöglichkeiten als funktionelle Kanäle vorliegen, und gibt ihr Vorkommen an. Auffällig ist die Organspezifität in der Verteilung der einzelnen Kombinationen. Aufgrund dessen spricht man häufig auch vom Herztyp, Pankreastyp oder glatten Muskeltyp bei den K_{ATP} -Kanälen.

Die vier bisher kombinierten K_{ATP} -Kanäle Kir6.1/SUR2B (Yamada et al., 1997; Satoh et al., 1998), Kir6.2/SUR1 (Inagaki et al., 1995a; Nichols et al., 1996), Kir6.2/SUR2A (Inagaki et al., 1996; Okuyama et al., 1998) und Kir6.2/SUR2B (Isomoto et al., 1996) lassen sich den nativen zuordnen. Die Eigenschaften dieser vier heterolog exprimierten Kombinationen gleichen in der Einzelkanalleitfähigkeit, in der Wirkung auf Nukleotide und in dem pharmakologischen Verhalten jeweils denen einzelner nativer K_{ATP} -Kanaltypen.

Kir6.2/SUR1 entspricht dem K_{ATP} -Kanal der β -Zellen im Pankreas. Auch für die α -Zellen in vivo vermutete man einen K_{ATP} -Kanal (Rajan et al., 1993; Ronner et al., 1993), der später ebenfalls als Kir6.2/SUR1 charakterisiert wurde (Bokvist et al., 1999). Kir6.2/SUR2A ist der in Herzmuskelzellen vorkommende K_{ATP} -Kanal. Kir6.1/SUR2B und Kir6.2/SUR2B sind wohl beide in glatten Muskelzellen exprimiert (Zhang & Bolton, 1996), unterscheiden sich aber deutlich voneinander in bezug auf Einzelkanalleitfähigkeit und Nukleotidwirkung. Kir6.1/SUR2B hat im Gegensatz zu den anderen drei kombinierten K_{ATP} -Kanaltypen, die Einzelkanalleitfähigkeiten von ca. 75 pS und ca. 80 pS aufweisen, eine Einzelkanalleitfähigkeit von ca. 33 pS (nativ ca. 30 pS). Wahrscheinlich bestimmt in erster Linie die α -Untereinheit die Größe der Kanalleitfähigkeit.

Eigenschaften

Die Kombination Kir6.1/SUR2B fällt zudem noch durch ein untypisches Nukleotid-Verhalten auf, da erstens bei Wegnahme des intrazellulären ATPs es nicht zu spontanen Kanalöffnungen kommt, wie bei Ohno-Shosaku et al. (1987) beschrieben, zweitens intrazelluläres ATP die Öffnungswahrscheinlichkeit bei geöffneten Kanälen nicht mindert und drittens Diphosphatische Nukleotide (NDP) den Kanal öffnen. Aufgrund dessen wird er von den klassischen K_{ATP} -Kanälen abgegrenzt und als K_{NDP} -Kanal bezeichnet (Kajioka et al., 1991; Beech et al., 1993; Nelson & Quayle, 1995; Zhang & Bolton, 1996). Das pharmakologische Verhalten ähnelt dem der klassischen K_{ATP} -Kanäle (Weston & Edwards, 1992, 1993), doch Unterschiede lassen sich auch hier finden (Sato et al., 1998, Fujita & Kurachi, 2000). In der vorliegenden Arbeit wird mit der Bezeichnung K_{ATP} der K_{NDP} einbezogen. Die Hemmung über ATP bei den klassischen K_{ATP} -Kanälen wird in erster Linie über die α -Untereinheit vermittelt (Tucker et al., 1998; Tanabe et al., 1999). Auch wenn die α -Untereinheit (Kir6.2) kein Walker-Motiv aufweist, hat sie wie die β -Untereinheit ebenfalls eine Bindungsstelle für ATP, die hoch affin für den Purin-Ring ist (Trapp et al., 1998; Tucker et al., 1998, Tanabe et al., 2000). Insgesamt ist die Regulation der K_{ATP} -Kanäle durch Nukleotide und Pharmaka äußerst komplex und zum Teil sind die Publikationen sogar widersprüchlich (siehe dazu Isomoto & Kurachi, 1997).

Es gibt pharmakologisch entwickelte Kaliumkanalöffner aus unterschiedlichen Stoffklassen wie z. B.:

- Diazoxid, ein Benzothiadiazin
(Trube et al., 1986⁺; Faivre & Findlay, 1989^{*}; Standen et al., 1989[#])
- Rilmakalim, ein Benzopyran
(Englert et al., 1992[#]; Terzic et al., 1994^{*}; Gögelein et al., 1998⁺)
- Pinacidil, ein Cyanoguanidin
(Escande et al., 1989^{*}; Ashcroft & Ashcroft, 1990⁺; Quayle et al., 1995[#])
- (Lev-) bzw. Cromakalim, ein Benzopyran
(Escande et al., 1988^{*}; Beech & Bolton, 1989[#]; Kozlowski et al., 1989⁺)
- Aprikalim, ein Carbothioamid
(Eltze, 1989[#]; Escande et al., 1989^{*}; Lebrun et al., 1991⁺)
- Nicorandil, ein Pyridin-Derivat
(Kakei et al., 1986^{*}; Garrino et al., 1989⁺; Kamouchi & Kitamura, 1994[#]).

Die Derivate des Sulfonylharnstoffs, z. B.:

- Glibenclamid
(Fosset et al., 1988^{*}; Niki et al., 1989⁺; Standen et al., 1989[#])
- Tolbutamid
(Trube et al., 1986⁺; Belles et al., 1987^{*}; Quayle et al., 1995[#]),

wirken als Kaliumkanalschließer. Außerdem beeinflusst ein ganzes Potpourri endogener Substanzen die K_{ATP} -Kanäle, z. B.: Adenosin (Dart & Standen, 1993), Angiotensin II (Kubo et al., 1997), ‚calcitonin gene-related-peptide‘ ‚CGRP‘ (Quayle et al., 1994), diverse Fettsäuren (Kim & Duff, 1990), Lactat und pH (Han et al., 1993), Proteinkinase A (Quayle et al., 1994; Kleppisch & Nelson, 1995), Proteinkinase C (Bonev & Nelson, 1996) und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ‚PIP₂‘ (Hilgeman & Ball, 1996; Baukrowitz et al., 1998).

⁺ Wirkung auf β -Zellen

^{*} Wirkung auf Herzmuskelzellen

[#] Wirkung auf glatte Muskulatur

Vorkommen

Wie bereits in Tabelle 1 dargestellt, gibt es ein organspezifisches Verteilungsmuster der einzelnen K_{ATP} -Kanaltypen. Auf der RNA-Ebene konnte folgende organspezifische Verteilung für das Meerschweinchen über RT-PCR ermittelt werden (siehe Abbildung 1.8). Dieses Ergebnis ist in der folgenden Tabelle mit den Ergebnissen früherer Arbeiten vergleichend dargestellt.

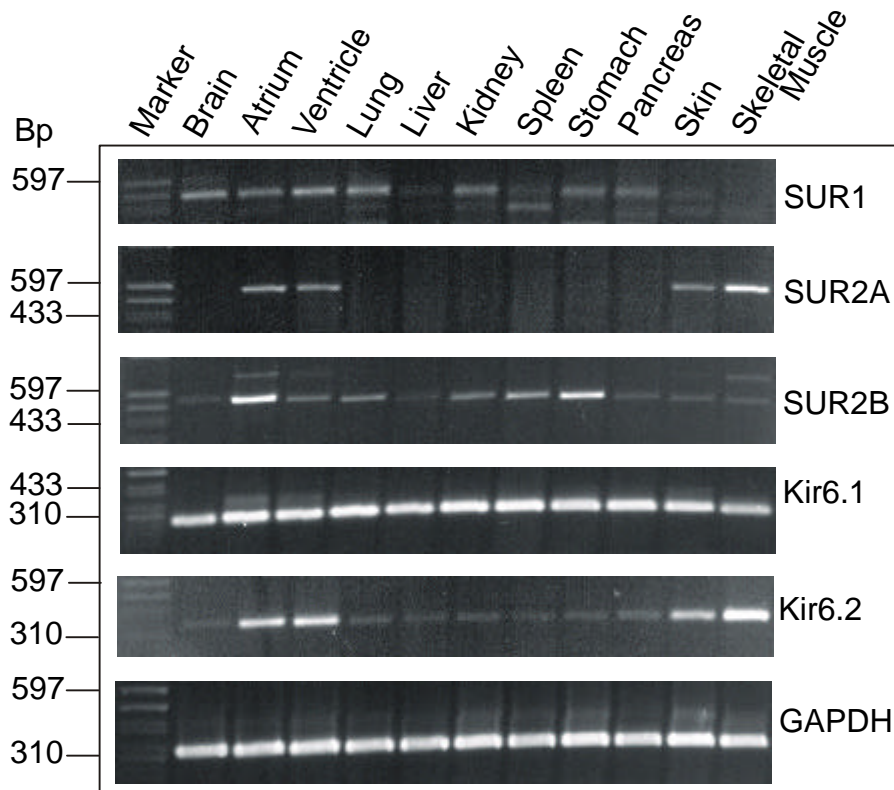


Abbildung 1.8

Expressionsmuster in verschiedenen Organen des Meerschweinchens

Mittels RT-PCR ermittelte Verteilung der α - und β -Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals in verschiedenen Organen SUR1 war in allen Organen bis auf den Skelettmuskel vorhanden. SUR2A exprimiert im Herzen (Vorhöfe und Kammern) sowie in der Skelettmuskulatur und in der Haut. SUR2B, Kir6.1 und Kir6.2 konnten in allen Organen nachgewiesen werden, wobei der Kir6.2 ein deutlich höheres Expressionsniveau hat in den Organen, in denen SUR2A exprimiert wird. Die GAPDH-Expression ist fast überall gleich stark ausgeprägt, was darauf hindeutet, daß ähnliche Mengen an Gesamt-RNA (120 ng) vorhanden waren. Alle α - und β -Untereinheiten des K_{ATP} -Kanals sind im Herzen (in den Vorhöfen und in den Kammern) vorhanden. (Versuche zur Organverteilung wurden von Dr. Regina Preisig-Müller durchgeführt.)

Tabelle 2

Vorkommen	SUR1	SUR2A	SUR2B	Kir6.1	Kir6.2
Gehirn	± / +	+ / -	+ / ±	+ / ++	+ / ±
Herz	± / +	+ / +	+ / ++	+ / ++	+ / +
Lunge	- / +	- / -	+ / +	+ / ++	+ / ±
Leber	- / ±	- / -	+ / ±	+ / ++	+ / ±
Pankreas	++ / +	- / -	+ / ±	+ / ++	++ / ±
Milz	n. b. / ±	- / -	+ / +	n. b. / ++	n. b. / ±
Niere	- / ±	- / -	+ / +	+ / ++	- / ±
Magen	- / ±	- / -	+ / ++	+ / ++	- / ±
Dünndarm	- / n. b.	- / n. b.	+ / n. b.	+ / n. b.	- / n. b.
Kolon	- / n. b.	- / n. b.	+ / n. b.	+ / n. b.	- / n. b.
Nebenniere	- / n. b.	n. b. / n. b.	n. b. / n. b.	+ / n. b.	- / n. b.
Hoden	- / n. b.	n. b. / n. b.	n. b. / n. b.	+ / n. b.	- / n. b.
Eierstock	- / n. b.	- / n. b.	+ / n. b.	+ / n. b.	- / n. b.
Gebärmutter	n. b. / n. b.	- / n. b.	+ / n. b.	n. b. / n. b.	n. b. / n. b.
Harnblase	n. b. / n. b.	+ / n. b.	+ / n. b.	n. b. / n. b.	n. b. / n. b.
Skelettmuskula	- / -	+ / +	+ / ±	+ / +	+ / +
Haut	n. b. / ±	n. b. / ++	n. b. / ±	n. b. / ++	n. b. / +
	Northern / *	RT-PCR / *	RT-PCR / *	Northern / *	Northern / *
	Inagaki et al., 1995c	Isomoto et al., 1996	Isomoto et al., 1996	Inagaki et al., 1995a	Inagaki et al., 1996

Links vom Schrägstrich steht das Expressionsniveau der K_{ATP} -Untereinheiten, die durch die unten in der Tabelle erwähnte Methode und Arbeit ermittelt wurden. Rechts vom Schrägstrich steht das über RT-PCR ermittelte Expressionsniveau (siehe dazu Mederos y Schnitzler et al., 2000). Grau markiert sind die deutlichen Unterschiede.

- nicht detektierbar, ± schwach vorhanden, + exprimiert, ++ stark exprimiert, n. b. nicht bestimmt,

* RT-PCR (Mederos y Schnitzler et al., 2000)

Auffällig sind vor allem die weitgehenden Übereinstimmungen in Vorkommen und Nichtvorkommen, auch wenn die Expressionsniveaus ‚schwach vorhanden‘, ‚exprimiert‘ und ‚stark exprimiert‘ unterschiedlich ausfallen.

Die grau unterlegten Unterschiede können sich größtenteils dadurch erklären lassen, daß im allgemeinen für die Detektion von RNA die RT-PCR- empfindlicher als die Northern-Methode ist. Dies gilt besonders für die Ergebnisse, bei der die RT-PCR eine schwach vorhandene Exprimierung aufweist (siehe - / ±). Der Unterschied beim Vergleich der Expressionsniveaus beider Methoden bei SUR1 in der Lunge (- / +) läßt sich so sicher nicht mehr

erklären. Vermutlich war der Northern-Blot für SUR1 nicht sensitiv genug. Die deutlichste Diskrepanz in der Exprimierung findet sich im Gehirn für den SUR2A (+ / -). Beide Ergebnisse sind mittels RT-PCR gewonnen. Isomoto et al. (1996) konnten allerdings nur im Kleinhirn der Maus SUR2A nachweisen. Die RNA aus dem Gehirn (einschließlich Kleinhirn) des Meerschweinchens wies keine SUR2A-Transkripte auf (n = 3).

K_{ATP}-Kanäle im Herzen

Abbildung 1.8 zeigt, daß alle Untereinheiten des K_{ATP}-Kanals im Herzen (Vorhöfe wie Kammern) vorkommen. Da der in den Herzmuskelzellen lokalisierte K_{ATP}-Kanal wahrscheinlich aus Kir6.2 und SUR2A besteht (siehe Abschnitt ‚Kombinationen‘), aber die andere α -Untereinheit und die beiden anderen β -Untereinheiten im Organ auch auftreten, wurde eine zellspezifische Methode entwickelt. Eine Trennung von einzelnen isolierten Herzmuskelzellen und einzelnen Kapillarfragmenten wurde mittels eines hydraulischen Zellpickers (siehe Abbildung 1.9) etabliert (Preisig-Müller et al., 1999c).

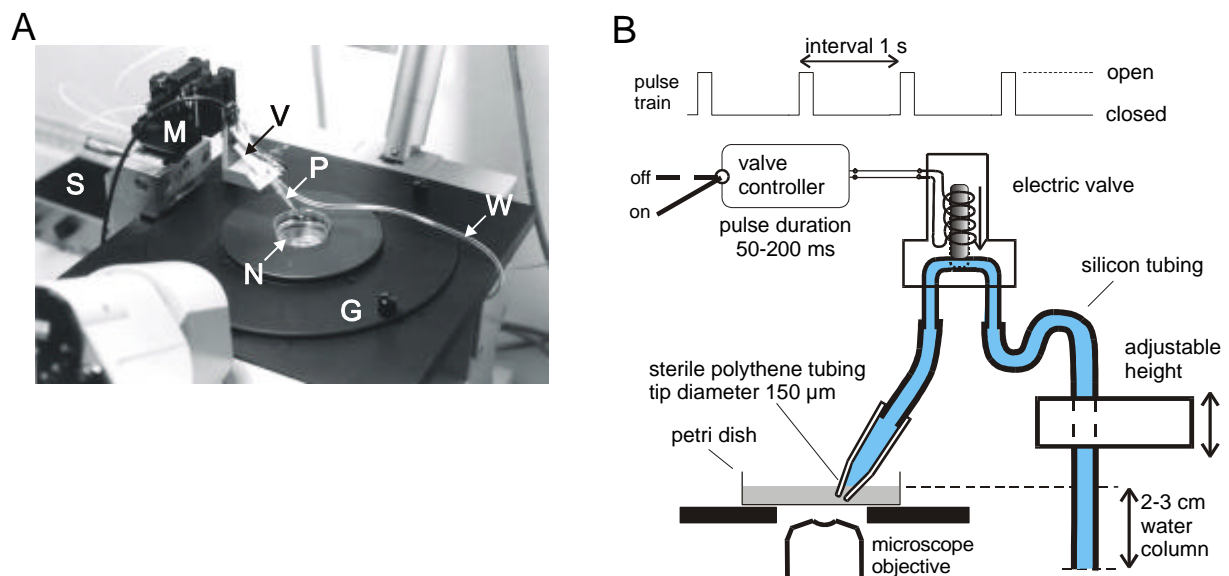


Abbildung 1.9

Hydraulischer Zellpicker

Abbildung A zeigt den hydraulischen Zellpicker an einem Mikromanipulator (M). Das Steuerelement (S) ist im Hintergrund zu sehen. Ein Gleittisch (G) dient als Objektstisch des inversen Lichtmikroskops (Zeiss IM 35). Das elektrisch gesteuerte Ventil (V) und die sterile Polyethylenspitze (P) befinden sich über einem im Durchmesser 35 mm großen Petrischälchen (N). Der Schlauch zum Einstellen der Wassersäule (W) liegt auf dem Objektstisch. Abbildung B stellt das Prinzip des hydraulischen Zellpickers dar. Das geschlossene Magnetventil verhindert den Sog, der durch die Wassersäule von 1 bis 3 cm entstehen würde. Durch das kurze Öffnen (50–100 ms) wird ein Sog appliziert, der bei einer Spitzenöffnung von ca. 150 µm im Durchmesser bis zu 200 nl Flüssigkeit aufsaugt.

Damit können einzelne Herzmuskelzellen und Kapillarfragmente aus der Suspension getrennt aufgesammelt werden (Näheres bei Preisig-Müller et al., 1999).

Die getrennt aufgesammelten Fraktionen – Herzmuskelzellen und Kapillarendothel – dienten einer Vielzellen-RT-PCR (Preisig-Müller et al., 1999a, b). Abbildung 1.10 stellt ein typisches Expressionsmuster für die K_{ATP} -Kanal-Untereinheiten dar.

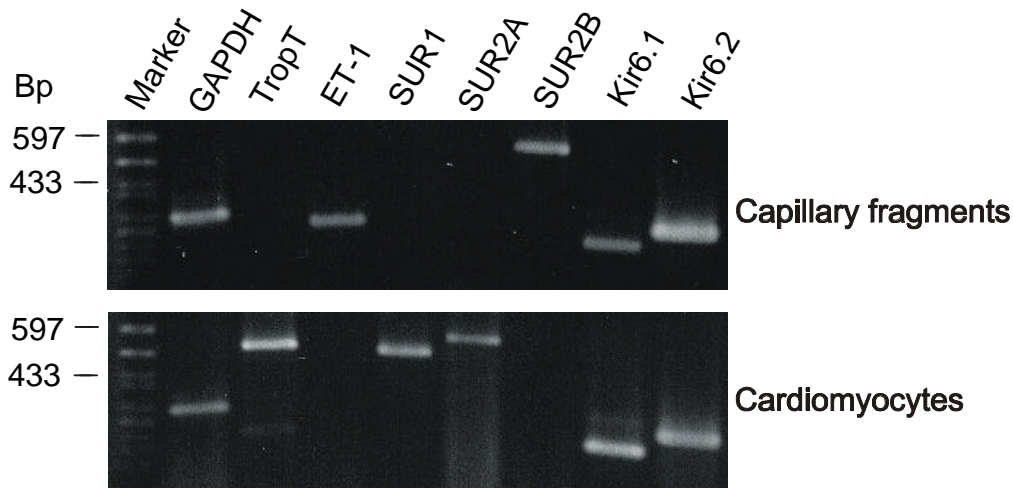


Abbildung 1.10

Expressionsmuster von α - und β -Untereinheiten für Herzmuskelzellen und Herzkapillarfragmente mittels einer Vielzellen-RT-PCR

Die Kapillarfragmente und Herzmuskelzellen sind aus den Herzkammern vom Meerschweinchen gewonnen. Die Trennung geschah mit Hilfe eines hydraulischen Zellpickers: etwa 1000 einzelne Herzmuskelzellen und 150 Kapillarfragmente wurden getrennt aufgesammelt. Jeweils ein Drittel der beiden gewonnenen RNA-Fraktionen werden zu cDNA umgewandelt. Die PCR wurde mit Gen-spezifischen Primern, die Intron-überspannend sind, durchgeführt, um sie von einer möglichen genomischen PCR zu unterscheiden (näheres siehe Mederos y Schnitzler et al., 2000). Bei Herzmuskelzellen und ebenso bei Kapillarfragmenten konnten jeweils beide α -Untereinheiten (Kir6.1 und Kir6.2) nachgewiesen werden. SUR1 und SUR2A – aber nicht SUR2B – werden in Herzmuskelzellen exprimiert. Hingegen ist nur der SUR2B in den Herzkapillaren vorhanden – SUR1 und SUR2A konnten nicht nachgewiesen werden. Die PCR von Troponin T und Endothelin-1 dienten als Kontrolle für die Reinheit der mit dem Zellpicker aufgesammelten Fraktionen. RNA-Troponin T findet sich nur in Herzmuskelzellen und RNA-Endothelin-1 nur im Kapillarendothel. Damit stellen die beiden PCR für die jeweilige Fraktion eine Positiv- wie eine Negativ-Kontrolle dar. Die Versuche wurden von Dr. Regina Preisig-Müller durchgeführt.

Das Expressionsmuster für die Kapillarfragmente zeigte, daß die beiden α -Untereinheiten Kir6.1 und Kir6.2 und SUR2B auf RNA-Ebene vorkommen. Obwohl K_{ATP} -Kanäle in verschiedenen Zelltypen vorkommen, war die Existenz im Endothel fraglich. Die meisten

elektrophysiologischen Untersuchungen zum Endothel werden an kultiviertem Endothel von großen Gefäßen durchgeführt (Nilius et al., 1997). Solche Zellkulturen weisen keine K_{ATP} -Kanäle auf (Mehrke et al., 1991; Bernd Nilius, mündliche Mitteilung). Andererseits konnten an frisch isolierten Endothelzellen der Aorta ATP-sensitive Kaliumströme beobachtet werden (Katnik & Adams, 1995, 1997). Für das mikrovaskuläre Endothel ist die Existenz des K_{ATP} -Kanals auch umstritten. Janigro et al. (1993) konnten in Primärkulturen von mikrovaskulärem Endothel aus Rattenhirn ATP-sensitive Kaliumströme nachweisen. Dagegen konnten bei frisch isolierten Kapillarfragmenten aus dem Gehirn der Ratte keine ATP-sensitiven Kaliumströme beobachtet werden (mündliche Mitteilung von Heinz Gögelein, siehe auch dazu Popp & Gögelein, 1992).

An frisch isolierten Herzkapillaren sprachen einige Indizien für die Existenz von K_{ATP} -Kanälen (Langheinrich & Daut, 1997). Der elektrophysiologisch gesicherte Beweis stand bisher noch aus.

Material und Methoden

Präparation der Herzkapillaren

Der Meerschweinchen-Stamm aus der ehemaligen Zucht der Bundesforschungsanstalt Tübingen wurde verwandt (BFA-Zucht, Charles River, Sulzfeld, Deutschland), denn es zeigte sich, daß bei diesem Stamm im Gegensatz zu Albino-Meerschweinchen-Stämmen zum einen die Herzentnahme einfacher und rascher erfolgen kann, weil der Gefäßbaum am Herzen weniger verfettet ist, und zum anderen, weil die gewonnenen Herzkapillaren sowie Herzmuskelzellen besser aussahen. Es wurden vorwiegend männliche Meerschweinchen im Gewichtsbereich von 200 bis 380 g zur Herzentnahme verwendet. Besonders eigneten sich für die Messungen an Herzkapillaren Meerschweinchen im Gewichtsbereich von 200 bis 250 g. In Übereinstimmung mit den Richtlinien der Tierschutzbehörde in Gießen (Regierungspräsidium) wurden mit einer kleinen Guillotine die Meerschweinchen dekapitiert, der Brustraum anschließend geöffnet und das Herz sofort herausgenommen. Die Aorta des herausgenommenen Herzens wird an einer Kanüle über eine Klemme befestigt (siehe Abbildung 2.1). Mittels einer peristaltische Pumpe (Minipuls 3, Abimed-Gilson, Langenfeld, Deutschland) wurden die Koronarien mit 6 bis 9 ml min⁻¹ flußkonstant perfundiert. Bei dieser retrograden Perfusion des isolierten Herzens (Langendorff, 1895; Döring & Dehnert, 1985) schließen sich die Aortenklappen, und die Lösung fließt über die Koronarostien durch die Koronargefäße. Das Perfusat verläßt das koronare Gefäßsystem über den Sinus coronarius im rechten Vorhof. Der koronare Perfusionsdruck konnte über den Drucksensor (NT143E-100RP, PMT, Ettringen, Deutschland) und den x-y-Schreiber (SE120, BBC Goerz Metrawatt, Ratingen, Deutschland) aufgezeichnet werden. Während der Perfusion war das Herz in einem kleinen 37 °C-warmen Bad eingetaucht. Die Perfusionslösungen wurden in einem Wasserbad und über einen Wärmeaustauscher auf 37 °C temperiert. Sie wurden zusätzlich mit Sauerstoff (Messer Griesheim, Frankfurt, Deutschland) über die Perlatoren (Fritten: Ø = 10 mm, Porosität 3, Schott, Jena, Deutschland) begast. Das isolierte Herz wurde zuerst mit einer physiologischen Perfusionslösung (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na-Pyruvat, 10 mM Glukose und 10 mM HEPES; pH 7.4, eingestellt mit 1 M NaOH) perfundiert. Dabei schlug das Herz, und sein Blut wurde ausgespült. Durch die Entnahme des Herzens kommt es zu einer Ischämie, die dazu führt, daß der koronare Gesamt-

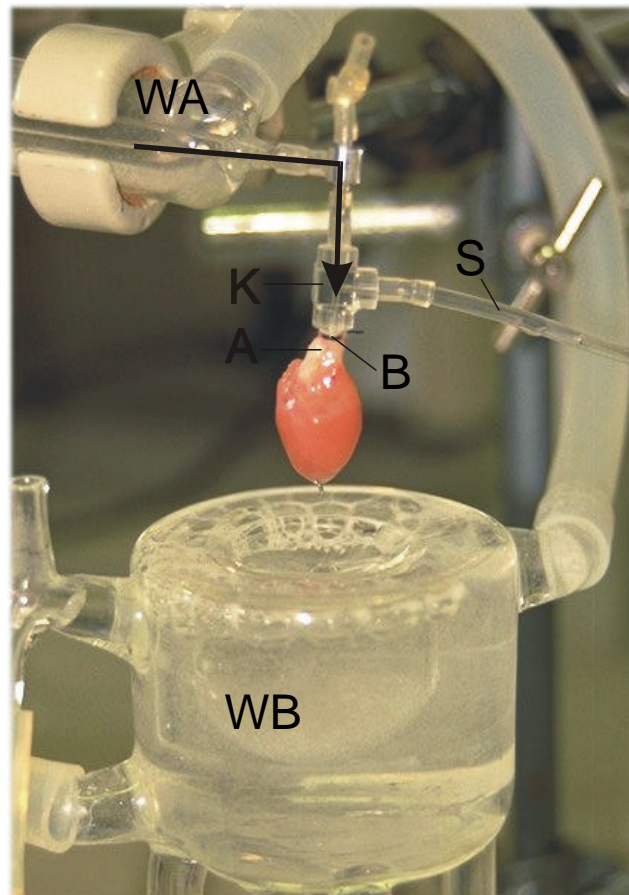


Abbildung 2.1

Retrograde Perfusion eines Meerschweinchen-Herzens

Die Aorta (A) ist über ein Bindfaden (B) an einer Kanüle (K) angebunden. Der Pfeil gibt den Fluß der Perfusionslösung aus dem Wärmeaustauscher (WA) zur Aorta an. Schlauch (S) führt zum Drucksensor. Das perfundierte Herz wird in das kleine Wasserbad (WB) eingetaucht.

widerstand, und damit der koronare Perfusionsdruck, abfällt. Bei flußkonstanter Perfusion steigt der koronare Perfusionsdruck normalerweise innerhalb von 10 Minuten auf ca. 80 mmHg (siehe Abbildung 2.2). Dieser Anstieg des koronaren Gesamtwiderstandes kann als ein Zeichen der Erholung der Herzmuskulatur gedeutet werden. Die weiteren Perfusionen wurden mit der oben genannten Lösung, bei der aber 10 mM Natriumchlorid durch Kaliumchlorid äquimolar ersetzt wurden (15 mM K^+ und 125 mM Na^+ Endkonzentration), fortgesetzt. Durch diese Lösung wurde das Herz stillgestellt und der koronare Perfusionsdruck stieg innerhalb der nächsten 10 Minuten weiter auf ungefähr 90 mmHg an. Beim stillgestellten Herzen braucht der Herzmuskel weniger Energie, so daß sich die Koronargefäße weiter konstringieren können und dadurch der koronare Perfusionsdruck weiter ansteigt. Nach dem Erreichen des maximalen Druckes wurde für genau 5 Minuten das Herz mit der nominell

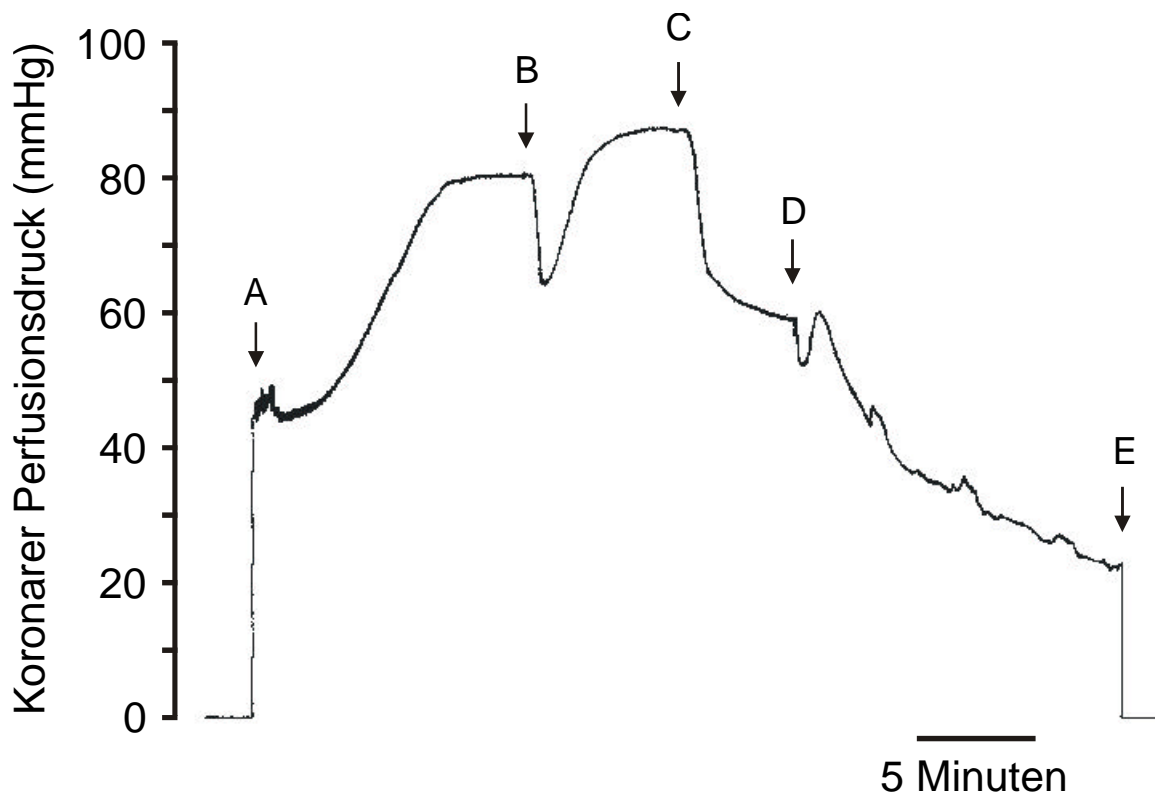


Abbildung 2.2

Retrograde flußkonstante Perfusion

Der typische Verlauf des koronaren Perfusionsdruck über die Zeit von einem exzidierten Herzen eines Meerschweinchen (Männchen, Körpergewicht 226 g) ist dargestellt. **A** gibt den Zeitpunkt an, bei der das Herz an die Perfusionsapparatur angeschlossen ist. Durch die Entnahme ist das Herz zu diesem Zeitpunkt ischämisch. Der Verlauf zwischen **A** und **B** zeigt einen raschen Druckanstieg von 45 auf 80 mmHg an, der in ein Fließgleichgewicht mündet. Dieser Verlauf stellt die Erholungsphase dar, charakterisiert durch die Erhöhung des koronaren Gesamtwiderstandes, der bei gegebenen konstantem Perfusionsfluß in ein Maximum endet. **B** gibt den Wechsel der Perfusionslösungen (von 5 mM KCl und 135 mM NaCl zu 15 mM KCl und 125 mM NaCl) an. Der darauf folgende transiente Druckabfall von ca. 15 mmHg stellt ein Charakteristikum dar. Durch die Erhöhung des extrazellulären Kaliums wird in den Gefäßmuskelzellen der elektrogene Pumpstrom der Natrium-Kalium-ATPase erhöht. Dies bewirkt dort eine Hyperpolarisation, die wiederum den Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalziumkanäle vermindert. Wenn der Kalzium-Ausstrom sich währenddessen nicht ändert, kommt es zur Abnahme des freien intrazellulären Kalziums und damit zu einer Relaxation der Gefäße und folglich dem koronarem Druckabfall. Der erhöhte Pumpstrom ist aber nur transient, weil es durch den erhöhten Natrium-Ausstrom zu einer Abnahme des intrazellulären Natriums kommt, die die Pumprate eben wieder erniedrigt. Daraus resultiert der anschließende Druckanstieg. Da die Lösung kardioplegisch wirkt, erhöht sich der koronare Druck aus energetischen Gründen um weitere 10 mmHg auf fast 90 mmHg. **C** gibt den Wechsel von den bisher immer 1 mM CaCl_2 -haltigen Lösungen zur nominell Kalzium-freien Perfusionslösung an, die genau 5 Minuten lang verabreicht wird. Sie löst die kalziumabhängigen Zellverbindungen und führt zu einem Druckabfall auf 60 mmHg, der sich durch den geringeren Kalzium-Einstrom erklären läßt. Der Lösungswechsel **D** bei dem die Kollagenase-haltige Lösung perfundiert wird, führt zu einen weiteren Druckabfall. Nach 10 Minuten (Zeitpunkt **E**) wird das Herz aus der Apparatur genommen.

Kalzium-freien 15 mM K^+ -Lösung perfundiert, um die kalziumabhängigen Zellverbindungen zu lösen. Danach wurde, um die extrazelluläre Matrix zu zerstören, für weitere 10 Minuten mit der Kollagenase-haltigen Lösung perfundiert (nominell Kalzium-freie 15 mM K^+ -Lösung mit zusätzlich 30 μ M Kalziumchlorid und 1.5 mg ml^{-1} CLS-2, Worthington/CellSystems, Katharinen, Deutschland oder Collagenase Blend, Type H, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Nach dem Kollagenase-Verdau werden die Herzkammern abgetrennt und in eine Erholungslösung (Isenberg & Klockner, 1982) überführt: 65 mM K-Glutamat, 45 mM KCl, 30 mM KH_2PO_4 , 3 mM $MgSO_4$, 0.5 mM EGTA, 20 mM Taurin und 10 mM Glukose (pH 7.4, eingestellt mit 1 M KOH; 23 °C). Mit einer Pasteurpipette, die eine Öffnung von ca. 3 mm hatte, wurden die zuvor mit einer feinen Schere zerstückelten Herzkammern trituriert. Tropfen von dieser Zellsuspension wurden in Petrischälchen (153066, $\varnothing = 35$ mm, Nunc, Dänemark), gefüllt mit der Erholungslösung, hineingegeben. Nach etwa 20 bis 30 Minuten wurde die Lösung in den Petrischälchen mit der physiologischen Salzlösung (5 mM K^+) ausgetauscht, so daß die nicht festgesetzten Zellen entfernt wurden. Normalerweise blieben einige wenige Kapillaren fest am Boden des Petrischälchens. Etwa 30 Minuten vor den elektrophysiologischen Untersuchungen wurden die Petrischälchen mit Desoxyribonuklease (DNase I, Type IV, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) inkubiert (350 – 400 Units pro Schälchen).

Elektrophysiologie

Zur Untersuchung des Kalium-Stromes über die K_{ATP} Kanäle an Herzkapillaren wurde die Patch-Clamp-Technik (Hamill et al., 1981) verwendet. Alle Messungen wurden bei einer Raumtemperatur von 23 °C mit Hilfe der inversen Mikroskope (zu Beginn Zeiss IM 35 und später Olympus IX 70) innerhalb von 12 Stunden nach dem Überführen der Herzkapillaren-Suspension in die Petrischälchen vollzogen. Zur Aufnahme wurde zu Beginn der EPC-7 Patch-Clamp-Verstärker (List, Darmstadt, Deutschland) mit einem modifizierten, digitalen Audio-Cassettenrecorder (Sony, DTC-55ES mit 44.1 kHz Abtastfrequenz) verwendet. Später wurde der Patch-Clamp-Verstärker Axopatch 200B (Axon Instruments, Foster City, USA) eingesetzt. Mit Hilfe der Analog/Digital-Karte (PCI-MIO-16XE-10, National Instruments, München) wurden Strom und Spannung digitalisiert und mittels eines von Horst Schneider in Labview geschriebenen Programms dargestellt und abgespeichert. Die gespeicherten Daten wurden mit einem Tiefpass-Besselfilter gefiltert, dabei waren die Filtergrenzfrequenzen höchstens halb so groß wie die Abtastfrequenzen, die zwischen 500 Hz und 5 kHz lagen. Bei Audiotapeaufnahmen benutzte ich den elektronischen Filter (LPBS-48DG, NPI, Tamm,

Deutschland) und bei computergespeicherten Aufnahmen ein kleines von Horst Schneider entwickeltes Analyseprogramm. Alle weiteren Analysen, zum Beispiel die Leitfähigkeitsbestimmungen, wurden mit dem Tabellenkalkulations-Programm Origin 5.0 gemacht. Zum Meßstandaufbau siehe Abbildung 2.3.



Abbildung 2.3

Meßstand

Oszilloskop (O), Filter (F), Steuerelement für Schrittmotoren (S), Verstärker (V), Monitor (Mo) und Ansteuerung (A) für die CCD-Kamera (C), inverses Mikroskop (IM), Perfusionssystem (P), Faradayschen Käfig (FK), Manometer (Ma), Steuerung (St) für Magnetventile (MV) und Autobatterie (B) dafür, Leistungseinheit für Schrittmotoren (L), Kunstmarmor-Tisch (T), Wandbefestigung für den Tisch (W). Computer und Drucker (hier nicht zu sehen) befinden sich unterhalb des Oszilloskops und Filters.

Konventionelle Ganzzelleableitung

Diese Methode wurde benutzt, um die passiven Eigenschaften der isolierten Herzkapillaren zu untersuchen. Hierzu wurden dünnwandige Borosilikatglaskapillaren mit Filament (GB 150TF-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland oder GC 150TF-10, Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, England) benutzt, die einen Außendurchmesser von 1.5 mm haben.

Die Glaskapillaren wurden mit dem horizontalen Puller (DMZ-Universal-Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Deutschland) gezogen und poliert. Das erstellte Pull-Programm* mit zwei Vorpulls und einem zweiphasigen Hauptpull, der schließlich die Glaskapillare auseinander reißt, ergab für die Patchpipetten GB 150TF-8P einen konstanten Widerstand von 6.1 M Ω (\pm 0.1 M Ω). Der anschließende Hitzepoliervorgang des Pull-Programms änderte diesen Pipettenwiderstand nicht. Erhöht sich der Pipettenwiderstand beim Poliervorgang, heißt das, die Pipettenspitze ist überpoliert und ihre Sealfähigkeit nimmt ab. Zu Beginn der Experimentierzeit benutzte ich zum Polieren die Microforge (MF-83, Narishige, Tokyo, Japan), später nur noch den oben genannten Puller, weil der Puller gleichwertige Poliererergebnisse erreichte.

Die Pipettenwiderstände lagen zwischen 5 und 8 M Ω . Niederohmige Pipetten erwiesen sich für das Patchen an Herzkapillaren als ungeeignet. Es konnte niemals mit einer 1.2 bis 3 M Ω Pipette gesealt werden, wofür vielleicht einfach geometrische Gründe die Ursache sind, denn mit diesen Pipetten ließen sich hervorragend Herzmuskelzellen patchen.

Um die Pipettenwiderstände genau einzustellen, reichte es bei dem oben beschriebenen Pull-Programm aus, nur einen Parameter zu verändern, nämlich die Zeitdauer zwischen dem Ende des Hauptpulls in der ersten Phase und dem Beginn des Hauptpulls in der zweiten Phase. Über diesen als Delay Pull 1 t(F1) bezeichneten Parameter konnten sowohl niederohmige als auch hochohmige Pipetten erzeugt werden, die sich zum Patchen eigneten. Auch die beiden Glassorten - Borosilikatgläser von Clark sind weicher als die von Science Products - konnten so angeglichen werden.

Um die Pipettenkapazität zu verringern, wurden bei allen konventionellen Ganzzellableitungen (und bei einigen Perforated-Patch-Ableitungen, siehe folgendes Kapitel) die Pipettenspitzen mit Sylgard (SYLG184, WPI, Berlin, Deutschland) beschichtet. Hierzu wurde das Sylgard angerührt (Binder zu Härter 10:1, gewichtsbezogen) und sofort in 1.5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Bei Raumtemperatur ließ ich es etwa eine Stunde lang aushärten, bis es viskos wurde und Fäden zog, um es dann im Gefrierschrank bei -28 °C zu lagern. Ein Aliquot reichte so für drei bis fünf Experimentiertage; es wurde immer sofort nach Gebrauch wieder eingefroren, so daß sich seine Viskosität kaum änderte. Die Beschichtung erfolgte mit Hilfe einer kleinen Apparatur unter einem Stereomikroskop (siehe Abbildung 2.4) und einer

* Pull A: Heat H 600, Force primer pull F(TH) 020, Distance treshold s(TH) 017, Delay heat stop t(H) 049, Distance heat stop s(H) 050, Adjust AD 021, Pull B: Heat H 085, Force primer pull F(TH) 030, Distance treshold s(TH) 010, Delay heat stop t(H) 030, Distance heat stop s(H) 000, Delay Pull 1 t(F1) 115, Force Pull 1 F1 170, Distance Pull 2 s(F2) 002, Force Pull 2 F2 185, Adjust AD 208

halbkreisförmig gebogenen Öse. Mit der linken Hand wurde die Glaspipette in einer Klemmvorrichtung um die eigene Längsachse gedreht; mit der rechten Hand wurde der Stift mit der Öse und dem Tropfen viskoses Sylgard gehalten. Ohne mit der Öse die Glaskapillare zu berühren, konnte ein Klecks Sylgard aufgetragen werden, der mit der Öse einen Faden bildete. Dieser Faden wurde durch Drehung der Pipette bis zur Pipettenspitze aufgewickelt.

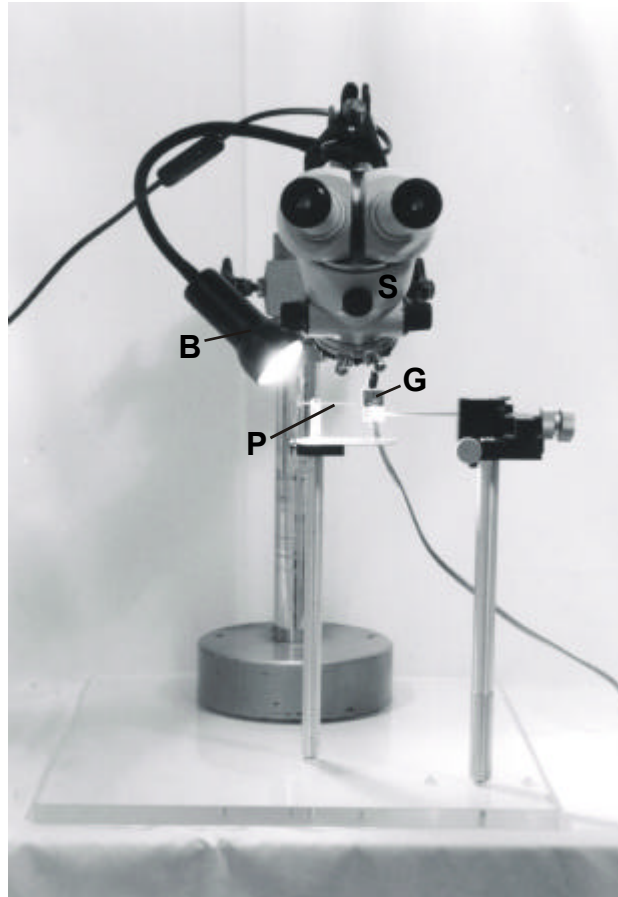


Abbildung 2.4

Apparatur zur Sylgardbeschichtung

Pipette (P), Glühfilament (G), Stereomikroskop (S), Beleuchtung (B)

Oft wurde auch einfach die von mir als Kleistermethode bezeichnete Sylgardbeschichtung verwendet: Ein Klecks wird in die Nähe der Pipettenspitze aufgetragen und mit Hilfe der Öse nach vorn gezogen, während sich die Pipette dreht. Beide Vorgehensweisen reduzieren die Pipettenkapazität um 2 bis 3 pF. Der größte Nachteil der Sylgardbeschichtung lag darin, daß mit Sylgard beschichtete Pipetten größere und asymmetrischere Minsken ausbilden als unbeschichtete, so daß vor allem bei der verwendeten steilen, fast senkrechten Pipettenhalterung die Abbildungsqualität nachließ und es schwieriger wurde, die Pipette richtig auf den Zellkernbereich der Herzkapillare zu positionieren.

Die Pipettenlösung für die konventionelle Ganzzelleableitung war: 45 mM KCl, 100 mM K-Aspartat, 10 mM EGTA, 1 mM CaCl₂, 3 mM MgCl₂, 2 mM Na₂ATP, 0.1 mM Na₃GTP und 10 mM HEPES (pH 7.2, eingestellt mit 1 M NaOH).

Perforated-Patch-Methode

Während bei der Ganzzelleableitung der Zellinhalt mit der Pipettenlösung dialysiert wird, vermeidet die Methode des perforierten Membranflecks (englisch: perforated patch) dieses Auswaschen des Zellinhaltes, so daß z.B. die natürliche Kalzium-Pufferung oder die ATP-Konzentration der Zelle unbeeinflusst bleibt (Korn et al., 1991).

Um einen elektrischen Zugang zur Zelle herzustellen, wird der gepatchte Membranfleck nicht aufgerissen wie bei der Ganzzelleableitung, sondern mit Hilfe von porenbildenden Molekülen erreicht, die sich in den Membranfleck einbauen (Horn & Marty, 1988). Dazu eignen sich Nystatin (Korn & Horn, 1989) und Amphotericin B (Rae et al., 1991). Beides sind Antimykotika, die von Streptomyceten synthetisiert werden.

Das Grundgerüst ist ein 38gliedriger Lactonring mit Methyl- und Hydroxy-Substituenten, einer Carboxygruppe und einem glykosidisch gebundenen Aminozucker. Der Lactonring ist bei Amphotericin B siebenfach ungesättigt, bei Nystatin sechsfach. Die Positionen der Hydroxygruppen sind auch unterschiedlich. Beide bilden in der Zellmembran von Eukaryonten Poren, die vor allem für Kationen, aber auch für Anionen wie etwa Chlorid permeabel sind; impermeabel sind sie für zweiwertige Ionen (Kalzium, Magnesium, Sulfat).

Die Poren haben einem Durchmesser von 8 Å und sind damit gerade noch durchlässig für Glukose, aber nicht mehr für Moleküle über 200 Dalton. Zusammengefaßt bedeutet dies, daß alle wichtigen intrazellulären Botenstoffe und Puffersysteme nicht über diese Porenbildner herausfließen können.

Die Perforated-Patch-Ableitung zeigt gegenüber der Ganzzelleableitung einen deutlich höheren Zugriffswiderstand. Damit besteht die Gefahr, daß das geklemmte Pipettenpotential nicht dem Potential der Zelle entspricht, weil über diesen Widerstand eine Spannung abfällt. Nystatin erzeugt einen relativ hohen Zugriffswiderstand von etwa 20-50 MΩ, während Amphotericin B einen von etwa 3-10 MΩ bewirkt. Aus diesem Grunde wurde Amphotericin B für die Perforated-Patch-Ableitungen benutzt. Hierzu wurden dünnwandige, filamentfreie Borosilikatgaskapillaren (GB 150T-8P, Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland oder GC 150T-10, Clark Elektromedical Instruments, Pangbourne, England) mit einem Außendurchmesser von 1.5 mm verwendet.

Die Glaskapillaren wurden ebenfalls mit dem horizontalen Puller (DMZ-Universal-Puller, Zeitz-Instrumente, Augsburg, Deutschland) gezogen, poliert und sofort weiter verwendet. Mit einer kleinen Apparatur (siehe Abbildung 2.5) wurde die fertig gezogene und polierte Glaskapillare mit Amphotericin B-freier Pipettenlösung gefüllt. Hierzu wurde an der Rückseite der Glaskapillare ein Unterdruck über eine 50 ml Perfusorspritze angelegt, und mittels eines mechanischen Dreiwegemanipulators wurde die Spitze der Glaskapillare in den frisch gefilterten Tropfen der Amphotericin B-freien Pipettenlösung eingetaucht. Die Zusammensetzung der Amphotericin B-freien Pipettenlösung war folgendermaßen: 45 mM KCl, 100 mM K-Aspartat, 1 mM $MgCl_2$, 0.5 mM EGTA und 10 mM HEPES (pH 7.2, eingestellt mit 1 M NaOH).

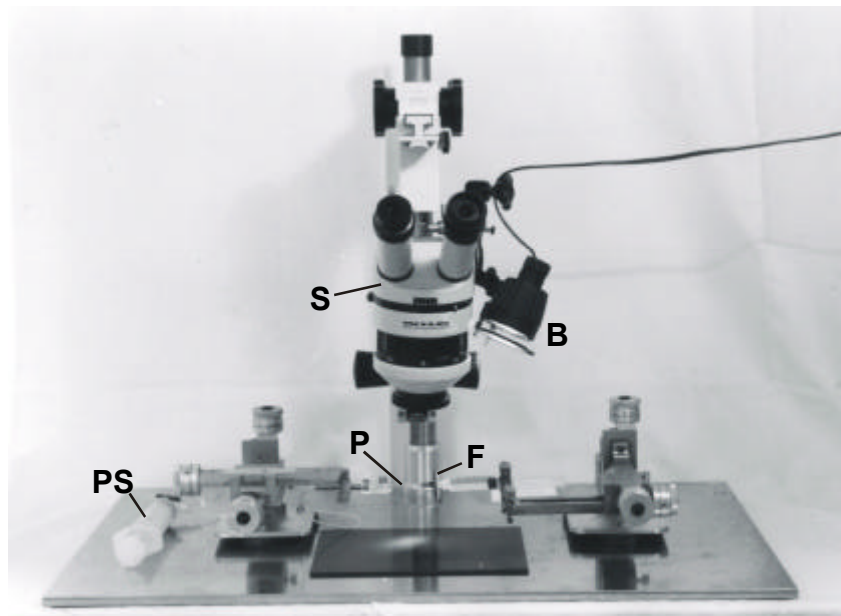


Abbildung 2.5

Apparatur zur Pipettenfüllung

Stereomikroskop (S), Beleuchtung (B), Filter (F) für Pipettenlösung, Pipette (P), Perfusorspritze (PS) für den Unterdruck

Unter einem Stereomikroskop wurde die Kapillarspitze zwischen 400 und 500 μm hoch gefüllt. Diese Höhe reichte aus, um genügend Zeit für die weiteren Schritte an der Zelle bis zur Sealbildung zu haben, denn es sollen während der Sealbildung noch keine Amphotericin B-Moleküle nach vorne an die Spitze diffundiert sein. Die rückseitige Füllung mit der Amphotericin B-haltigen Pipettenlösung wurde mittels einer lichtgeschützten Spritze und einer damit verbundenen dünnen und flexiblen Kapillare (MicroFil 34 AWG, World

Precision Instruments, Sarasota, USA) durchgeführt. Die Amphotericin B-haltige Lösung wurde zuvor mit einem Ultraschallbad behandelt, damit sich das Amphotericin B gut löst. Die Endkonzentration des Amphotericin B war 300 µg/ml. Die Stammlösung, die täglich frisch angesetzt wurde, wies 20 mg/ml Amphotericin B in DMSO auf. Das Donnan Potential über dem perforierten Membranfleck, das durch die nicht permeablen Proteinanionen der Zelle entsteht, wurde für diese Pipettenlösung als vernachlässigbar klein (< 1 mV) angenommen. Die Perforation des Membranflecks geschah in der Regel kurz nach der Sealbildung und erreichte ihr Gleichgewicht innerhalb von 5 bis 10 Minuten (siehe Abbildung 2.6).

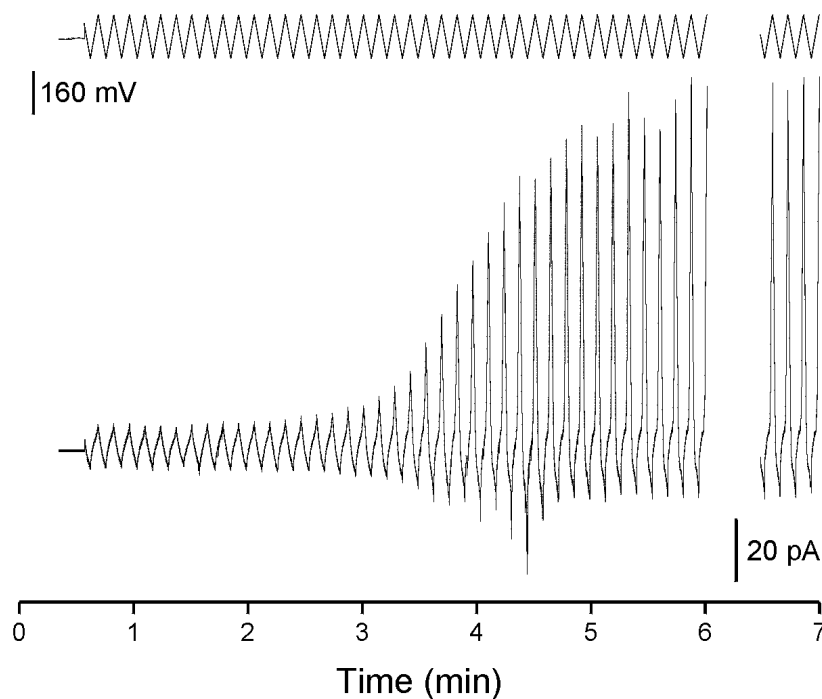


Abbildung 2.6

Zeitverlauf der Perforation durch Amphotericin B nach der Sealbildung

Die Wirkung von Amphotericin B auf die Stromantwort von sich wiederholenden Spannungsrampen ist dargestellt. Die Sealbildung ist zum Zeitpunkt 0 geschehen. Der Anstieg der Strommaxima kann als Einbau der porenbildenden Amphotericin B-Molekülen in den Membranfleck angesehen werden. Ab der 6. Minute findet eine Sättigung der Strommaxima statt - der maximale elektrische Zugriff durch die eingebauten Amphotericin B-Moleküle ist erreicht.

Offsetpotential

Nach dem Eintauchen der Patchpipette mittels Mikromanipulator wurde das Offsetpotential korrigiert. Es handelt sich hier um ein Potential, das an den Übergängen innerhalb

der Meßkette Silberdraht-Pipettenlösung-Salzlösung im Bad-Referenzelektrode gebildet wird. Die Korrektur wurde folgendermaßen vorgenommen: Die Patchpipette wurde in die Nähe der zu messenden Kapillare gefahren – etwa 5 bis 10 μm über der Zelloberfläche – und war so noch niederohmig mit dem Bad verbunden. Jetzt wurde die Nullpunkteinstellung vorgenommen, das heißt, es wurde ein Potential appliziert, bei dem kein Strom zwischen Patchpipette und Referenzelektrode fließt, und dies wurde dann als Nullpotential definiert. Dieses geschah beim EPC-7 im dafür vorgesehenen Search-Modus oder beim Axopatch 200B im äquivalenten Track-Modus. Man muß aber nicht diese besonderen Funktionsmodi verwenden, sondern kann einfach in diesem Fall im Stromklemm-Modus – beim EPC-7 „CC“ und beim Axopatch 200B „I=0“ – das Offsetpotential korrigieren. Diese Vorgehensweise der Offset-Korrektur korrigiert aber nicht das Liquid-Junction-Potential.

Liquid-Junction-Potential

Das Liquid-Junction-Potential ist ein Übergangspotential, das zwischen verschiedenen Elektrolyten, beispielsweise der Pipettenlösung und der Salzlösung im Bad, entsteht (Barry & Lynch, 1991). Die Membranpotentiale und Klemmpotentiale sind mit den jeweiligen Liquid-Junction-Potentialen erst in der Auswertung korrigiert worden. Das Liquid-Junction-Potential wurde für die beiden verwendeten Pipettenlösungen direkt gemessen. Dazu mußte eine Referenzelektrode mit 3 M KCl und Agarbrücke hergestellt werden. Die Messung des Liquid-Junction-Potentials kann nur mit dieser Referenzelektrode erfolgen, und sie beginnt, indem eine Patchpipette in ein Bad mit derselben Pipettenlösung getaucht wird. Das Offsetpotential muß dann auf Null gestellt werden (Search-, Track- oder I=0-Modus sind hier zu verwenden). Nach der Nullpunkteinstellung wird die Pipettenlösung im Bad durch die physiologische Salzlösung ausgetauscht, und es kann dann in den oben genannten Modi das Liquid-Junction-Potential abgelesen werden (Achtung: Vorzeichen des Liquid-Junction-Potentials ändert sich bei Ganzzellaufleitungen). Die bisher genaueste Anleitung für die Bestimmung des Liquid-Junction-Potentials ist von Erwin Neher verfaßt (Neher, 1992). Für die Perforated-Patch-Ableitungen beispielsweise wurden die Liquid-Junction-Potentiale gemessen, + 8.0 mV bei der physiologische Salzlösung (5 mM K^+) und + 3.7 mV bei der Hoch-Kaliumlösung (140 mM K^+).

Mikromanipulator

Anfänglich wurde mit dem hydraulischen Mikromanipulator (M-103, Narishige, Tokyo, Japan; kleinste Schrittweite 2 μm) die Patchpipette bewegt. Dabei zeigte sich, daß die Annäherung an die Membranoberfläche der Zellkernbereiche von den Herzkapillaren zur Sealbildung nicht fein genug gelang. Bei Herzmuskelzellen war dies kein Problem, und es konnte gut gesealt werden. Später verwendete ich einen mit Schrittmotoren versehenen Mikromanipulator (PatchMan, Eppendorf, Hamburg, Deutschland; kleinste Schrittweite 157 nm), der ein kontrolliertes Annähern an die Zelloberfläche ermöglichte, und damit erlangte ich den besten Abstand zur Sealbildung. Beide Mikromanipulatoren wurden direkt an dem Objektivtisch des Mikroskops befestigt, damit eventuelle mechanische Schwingungen oder Erschütterungen sich gleichförmig auf das zu messende Präparat und die Pipettenspitze auswirken und keine Relativbewegung entstehen können. Aus den genannten Gründen wurde neben der kurzen und festen Verbindung zwischen Mikromanipulator und Objektivtisch darauf geachtet, daß nur kleine Hebel zwischen den drei Achsen des Manipulators und dem Vorverstärker (englisch: head stage oder probe) vorhanden waren (siehe Abbildungen 2.7 und 2.8).

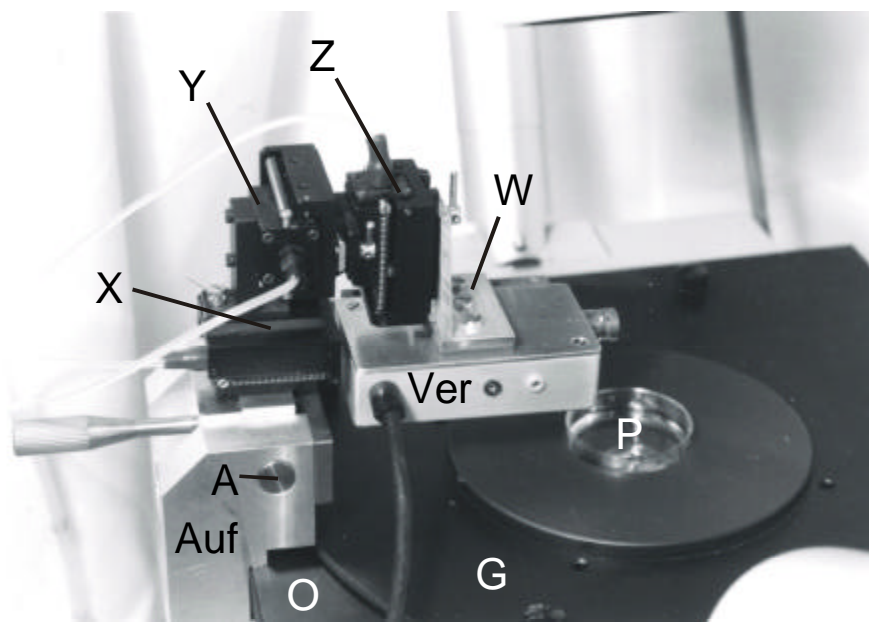


Abbildung 2.7

Befestigung des EPC-7 Vorverstärkers

Die 3 Achsen (X, Y, Z) des hydraulischen Mikromanipulators sind drehbar auf einer festen Achse (A), die fest über einen Aufbau (Auf) an den Objektivtisch (O) befestigt ist, verbunden. An der z-Achse (Z) ist der Vorverstärker (Ver) über ein Winkelstück (W) befestigt. Das Petrischälchen (P) sitzt im Gleittisch (G).

Unterbau

Ein schwerer Kunstmarmor-Tisch (L x B x H: 80 cm x 76 cm x 6 cm) diente als Unterlage für das Mikroskop, das, „fest“ durch sein Eigengewicht, über eine Dreipunktunterlage mit dem Tisch verbunden war – die vier Gummifüße des IX 70 Mikroskops wurden damit über-

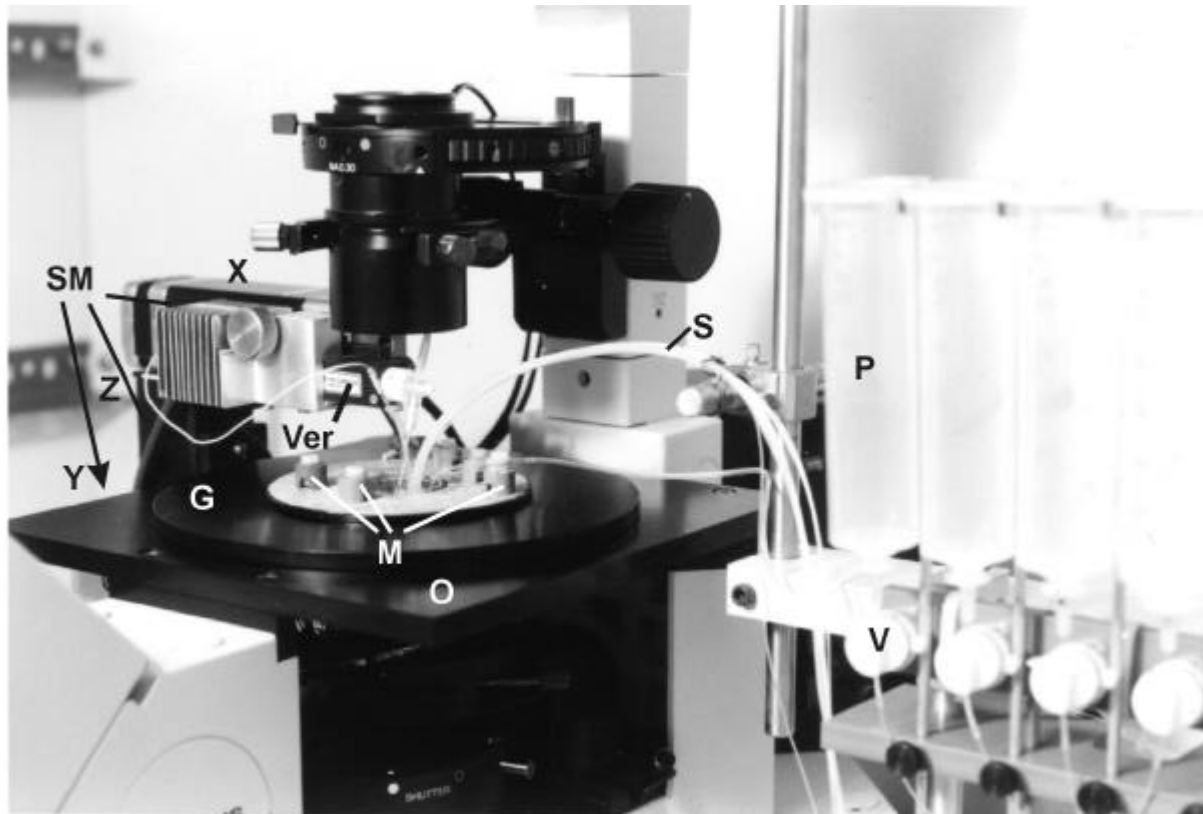


Abbildung 2.8

Meßaufbau

Die Schrittmotoren (SM) sind direkt an den Objektivtisch (O) befestigt. Y-Achsen-Motor (Y, hier nicht zu erkennen) befindet sich unterhalb des Objektivtisches. Am Schrittmotor für die x-Achse (X) ist der Vorverstärker (Ver) befestigt. Das Perfusionsystem ist aus Perfusorspritzen (P) als Vorratsgefäße, mit Magnetventilen (V) und Schläuchen (S), die zur Meßkammer führen, aufgebaut. Das Petrischälchen sitzt im Gleittisch (G). Die Magnete (M) klemmen über einen Federstahl die Meßkammer fest auf den Boden der Petrischale.

brückt. Dieser Tisch wurde über eine fest verschweißte Stahlträger-Konstruktion (40 mm Vierkant-Rohr) mit vier pneumatischen Schwingungsdämpfern (Vibrationsisolator - maximal 4 bar, 4.2 Hz Eigenfrequenz, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) an eine tragende Wand (Altbau) aufgehängt (siehe Abbildung 2.3). Diese Aufhängung erübrigte den Kauf eines kommerziellen Tisches mit aktivem Rückkopplungsausgleich, den man für den im Labor vorhandenen Holzfußboden hätte einsetzen müssen.

Sealbildung

Meistens wurde auf die Patchpipette ein Überdruck von 10 cm Wassersäule gegeben, um ein Verschmutzen der Pipettenspitze während des Eintauchens in die Salzlösung zu verhindern. Da die Patchpipetten fast senkrecht geführt waren (nicht mehr als 20 ° zur Senkrechten), brauchte man den Überdruck eigentlich nicht, denn die Pipettenlösung in der Kapillare bildete eine Wassersäule von über 3 cm. Dies ist ausreichend für ein Herausfließen der Pipettenlösung, damit die Pipettenspitze nicht verstopft oder verschmutzt wird.

Das Bewegen der Patchpipette in der Salzlösung geschah unter Sichtkontrolle. Beim Zeiss IM 35 wurde die Abwärtsbewegung der Patchpipette zur Zelloberfläche - die letzten Mikrometer vor der Sealbildung - noch direkt über das Mikroskop kontrolliert (400fache Gesamtvergrößerung). Beim Olympus IX 70 hingegen wurde mit Hilfe der CCD-Kamera (KAM02E, EHD, Damme, Deutschland) und dem Schwarz-Weiß-Monitor (MON12HR, EHD, Damme, Deutschland) die Abwärtsbewegung bei einer 600fachen Gesamtvergrößerung verfolgt. Dies erleichterte die Beobachtung des Annäherns der Pipettenspitze an die Zelloberfläche immens.

Anzumerken ist, daß man mindestens eine 400fache Gesamtvergrößerung braucht, um die Qualität der präparierten Kapillaren einzuschätzen. Vor allem die Zelloberfläche und die Zellgrenzen sind wichtige Qualitätsmerkmale, die etwas über die Wahrscheinlichkeit der Sealbildung aussagen. Beim letzten Mikrometer des Annäherns wurde die Stromantwort auf den Sealpuls im Spannungsklemm-Modus (Rechtecksprung von -5 mV 125 ms lang nach +5 mV 125 ms lang und wieder nach -5 mV) beobachtet. Die Stromamplitude durfte beim letzten Annähern nicht kleiner als 80% des Anfangswerts sein, um eine gute Sealbildung zu erhalten. Selten bildete sich, wenn der Überdruck von der Pipette genommen wurde, spontan ein Seal. In der Regel konnte erst durch vorsichtiges Ansaugen ein Seal gebildet werden.

Referenzelektrode

Als Referenzelektrode wurden selbst hergestellte Silber-Silberchlorid-Elektroden verwendet (siehe Abbildung 2.9). Ein ca. 4 cm langer Silberdraht ($\varnothing = 300 \mu\text{m}$) wurde in 150 mM Kaliumchlorid-Lösung getaucht, die an die Kathode einer Gleichspannungsquelle angeschlossen war – der Silberdraht an die Anode. Die Chlorierung wurde zwischen 100 und 150 μA bei ca. 1.5 V für ca. eine Stunde vorgenommen. Die Silberchlorid-Beschichtung hielt 3 bis 4 Wochen. Höhere Chlorierungsströme bildeten eine nicht so haltbare Silberchlorid-Beschichtung. Das blanke Ende des chlorierten Silberdrahtes wurde mit einem vergoldeten Adapterstift (isolierter Lötstützpunkt: „MicroPAT“, TWK-Elektronik, Düsseldorf,

Deutschland) verbunden und elektrisch mit dem 2-Komponenten-Epoxidharz-Kleber („plus endfest 300“, UHU, Bühl, Deutschland) und einem ca. 3 mm langen Polyethylen-Schlauch (MED-PE-Mikroschlauch 28479, $\varnothing_i = 0,86$ mm, $\varnothing_a = 1.52$ mm, Reichelt, Heidelberg, Deutschland) isoliert. Ein weiterer 5 cm langer Polyethylen-Schlauch ($\varnothing_i = 1.45$ mm, $\varnothing_a = 1.8$ mm) wurde mit 150 mM KCl Lösung größtenteils gefüllt und ein Ende in 3%igen Agar (3 g Agar-Agar und 97 ml 150 mM KCl) eingetaucht, damit die Referenzelektrode eine Agarbrücke besitzt, um die Chloridkonzentration der Elektrode konstant zu halten und um die giftigen Silberionen vom Präparat fernzuhalten. Dieser so gefüllte Schlauch wird über den chlorierten Silberdraht gestülpt und über den kleineren Schlauch gezogen. Fertige Referenzelektroden wurden, um sie vor Austrocknung zu schützen, in 150 ml KCl-Lösung getaucht und im Kühlschrank aufbewahrt.

Als Alternative neben der eben beschriebenen elektrochemischen Chlorierung kann eine chemische Chlorierung vorgenommen werden. Hierzu wird ein Silberdraht, der vorher mit technischem Azeton gereinigt worden ist, für 3 Minuten in eine Lösung von 25 g Eisen-III-chlorid in 100 ml 10%iger Salzsäure getaucht. Anschließend wird der Draht mit 10%iger Salzsäure gereinigt und mit destilliertem Wasser gespült.

Eine Silberchlorid-Beschichtung kann mit 10%iger Ammoniak-Lösung aufgelöst werden, so daß gebrauchte Elektroden recycelt werden können.

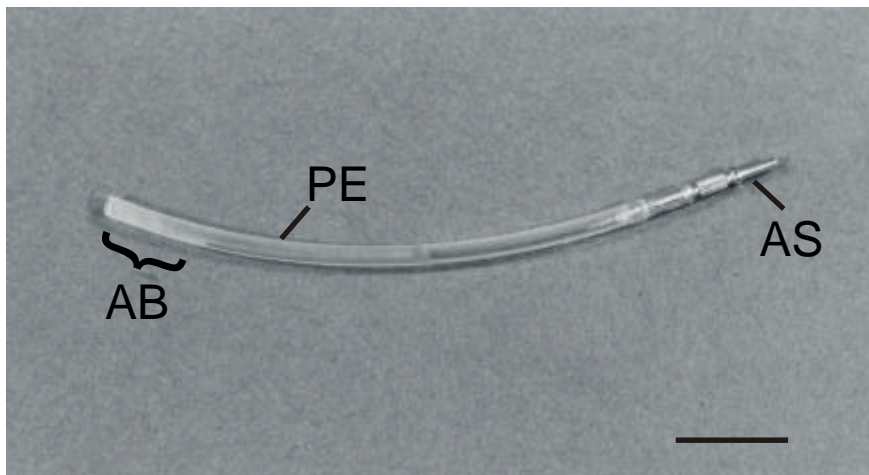


Abbildung 2.9

Referenzelektrode

Referenzelektrode mit Agar-Brücke (AB), vergoldetem Adapterstift (AS), Polyethylen-Schlauch (PE) und einem ca. 4 cm langer chlorierter Silberdraht in 150 mM KCl-Lösung (Meßbalken: 1 cm)

Pipettenhalter und Rauschen

Der Pipettenhalter hat die Aufgabe, die Patchpipette sicher und stabil zu fixieren, die elektrische Verbindung zur Headstage herzustellen und schließlich das Anlegen eines Unter- bzw. Überdrucks zu ermöglichen. Besonders wichtig in meinem Fall war, daß die Patchpipette auch kein mechanisches Spiel hatte, wenn von Überdruck (oder von „Nulldruck“) zu Unterdruck gewechselt wurde. Dieser Wechsel geschieht bei der Sealbildung oder beim Übergang in den Ganzzelleleitmodus und kann die Erfolgsquote für Messungen an Kapillaren stark erniedrigen. Im Laufe der Zeit wurde der Pipettenhalter bezüglich Stabilität und Rauschen verbessert (siehe Abbildung 2.10). Anfänglich wurde der Halter A für den EPC-7 eingesetzt; dieser wurde dann für den Axopatch 200B angepaßt (Halter B) und weiter entwickelt (Halter C, D, E).

Tabelle 3

Halter	Material	Druckschlauch-anschluß	Verbindungs-Silberdraht	Dichtung	Gewicht [g]	Rauschen [fA_{RMS}]
A	Messing, Teflon	Stahlrohr	Lötzinn	Gummiring	6.4	-
B	Messing, Teflon	Stahlrohr	Lötzinn	Gummiring	9.0	87
C	Messing, Teflon	Messing	Quetschung	Teflonhülse	7.0	72
D	Polycarbonat, Teflon	Polycarbonat	Quetschung	Teflonhülse	2.6	10
E	Polycarbonat, Teflon	Polycarbonat	Quetschung	Teflonhülse	3.5	8

Halter A und B haben einen O-Ring aus Gummi zur Dichtung und weisen ein mechanisches Spiel auf. Dieser Gummiring wurde durch eine Hülse aus Teflon ersetzt, die ca. 8 mm lang und 1.8 mm im Außendurchmesser ist. Die Teflonhülse ist an beiden Enden konisch und sitzt wie der Gummiring in der Verschraubung. Durch Anziehen der Verschraubung pressen sich jeweils die beiden Konusse ringförmig um die Patchpipette, so daß die Patchpipette an zwei Stellen fest fixiert ist. Damit war für die Patchpipetten in den Haltern C, D und E ein spielfreier Sitz gewährleistet.

Bei der Entwicklung stellte sich zusätzlich heraus, daß metallene Pipettenhalter erheblich mehr Rauschen aufweisen als Pipettenhalter aus Plexiglas oder Polycarbonat. Dies liegt daran, daß metallene Halter als Empfangsantenne für elektromagnetische Felder wirken. Erst extrem kleine metallene Halter (Benndorf, 1995) ermöglichen ein sehr gutes Signal-Rausch-Verhältnis, weisen aber dafür keine gute mechanische Stabilität auf. Solche sollten dann aus Feinsilber und nicht aus Messing hergestellt werden.

Auch die Verbindung chlorierter Silberdraht zur Headstage wurde dahingehend verändert, daß die gelötete Verbindung durch eine Quetschverbindung ersetzt wurde. Dies führt zu einer Verringerung des Rauschens der Thermospannung am Kontakt. Die Abbildung 2.11 zeigt das Rauschen mit den einzelnen Komponenten.

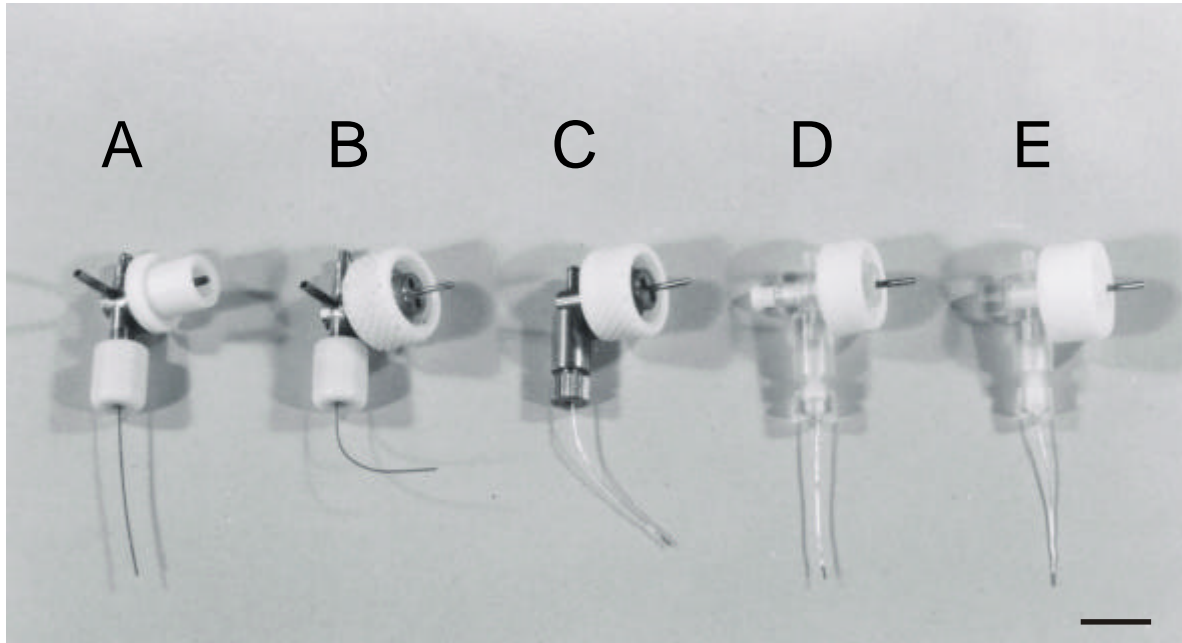


Abbildung 2.10

Verwendete Pipettenhalter

Halter A wurde für den EPC-7 eingesetzt; Halter B-E wurden beim Axopatch 200B verwendet. Eigenschaften zu den Haltern siehe Tabelle Seite 33. Maßbalken: 1 cm

Statt eines normalen „nackten“ Silberdrahts für den Pipettenhalter hat sich ein Teflonummantelter Silberdraht (AGT1010, $\varnothing = 0.25$ mm, WPI, Sarasota, USA) bewährt. An ihm werden nur die letzten 2 mm von der Teflonummantelung entfernt und dann chloriert. Er hielt in der Regel 3 bis 4 Wochen, während der nackte Silberdraht jeden Tag neu chloriert werden mußte, weil durch das Wechseln der Patchpipetten die Silberchlorid-Beschichtung abgekratzt wird.

Perfusionssystem

Das Perfusionssystem wurde selbst gebaut (siehe Abbildung 2.8). Hierzu wurden für die verschiedenen Salzlösungen 50 ml Perfusorspritzen als Vorratsgefäße benutzt. Die Spritzenausgänge waren über die Schläuche (Silikonschlauch für das Magnetventil $\varnothing_i = 0.8$ mm, $\varnothing_a = 1.6$ mm, Anderson, Dortmund, Deutschland und MED-PE-Mikro-Schlauch 28471,

$\varnothing_i = 0.58 \text{ mm}$, $\varnothing_a = 0.96 \text{ mm}$, Reichelt, Heidelberg, Deutschland) mit der Meßkammer verbunden. Mit Hilfe der Magnetventile (Miniaturquetschventil, 161P011, 12 V, stromlos geschlossen, Anderson, Dortmund, Deutschland) konnten die verschiedenen Salzlösungen über

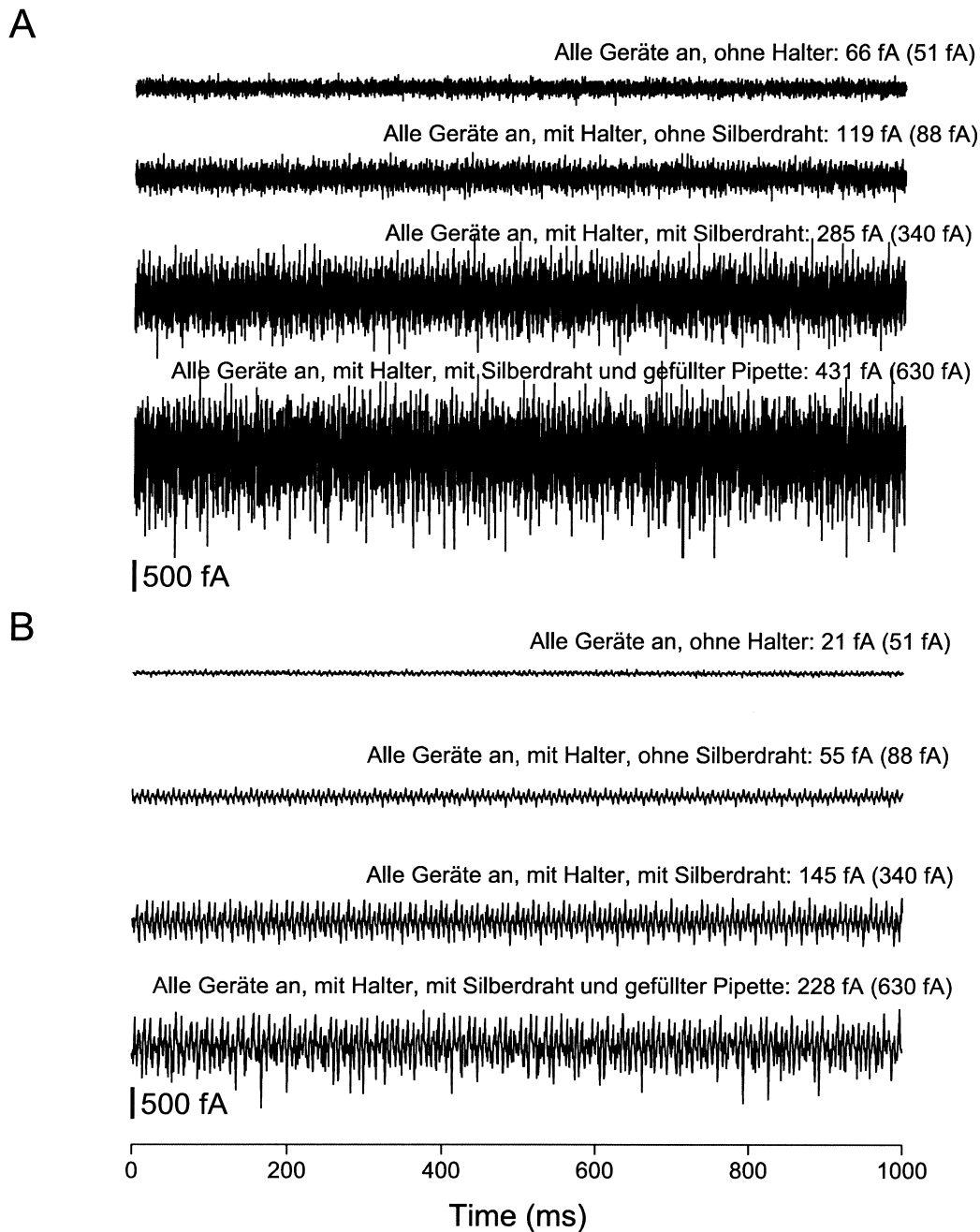


Abbildung 2.11

Rauschen

Die oberen 4 Spuren (Graph A) zeigen das Rauschen mit einem 5 kHz Besselfilter und einer 10 kHz Digitalisierung, die unteren 4 Spuren (Graph B) mit einem 1 kHz Besselfilter und einer 2 kHz Digitalisierung. Alle Stromspuren sind im Patch-Modus bei 50 mV/pA im 'open-loop' in Meßposition aufgenommen. Die Werte in Klammern sind die mittels eines internen Butterworth-Bandpassfilter (30 Hz – 5 kHz) gemessenen Rauschwerte. Alle Werte sind als ‚root mean square‘ angegeben.

ein Schalter an- und abgeschaltet werden. Als Stromversorgung wurde eine Autobatterie (12 V / 36 Ah) in den Faraday'schen Käfig eingebaut. Die allein durch Gravitation verursachte Perfusion der Meßkammer war charakterisiert zum einen durch die Perfusionsrate von 250 μl pro Minute und zum anderen durch den Lösungswechsel von 32 Sekunden (Zeitdauer des völligen Austausches von der Hochkalium- zur physiologischen [5 mM K^+] Salzlösung). Bei diesem Schlauchsystem reichte eine Wassersäule von etwa 11 cm aus, bei den früher verwendeten Schlauchsystemen mit dem englumigen Schlauch (PVC-Mikro-Pumpenschlauch 27148, $\varnothing_i = 0.25$ mm, $\varnothing_a = 2.07$ mm, Reichelt, Heidelberg, Deutschland) eine von 32 cm. Das Absaugen geschah mit einer rechtwinkelig gebogenen Glaskapillare über eine Peristaltikpumpe (12 V, Eigenbau, Physiologie, München).

Meßkammer

Aus Plexiglas wurde eine Meßkammer hergestellt (siehe Abbildung 2.12), die einen Kanal

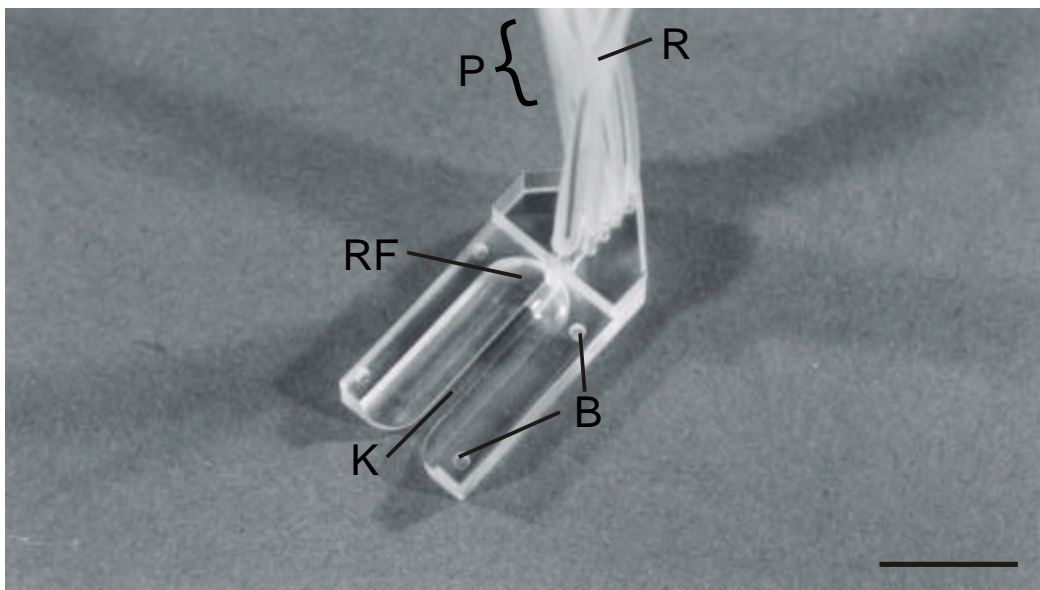


Abbildung 2.12

Meßkammer

Referenzelektrode (R), Perfusionsschläuche (P), Kanal (K), Rundfräsung (RF), Bohrungen für den Federstahl zur Klemmung (B), Meßbalken: 1 cm

(L x B x H: 25 mm x 1.3 mm x 1.0 mm; effektive Kanallänge: 11 mm) bildet. Die Meßkammer besitzt 8 vertikale Bohrungen für die Perfusionsschläuche und eine für die Referenzelek-

trode, die mit dem Kanal verbunden sind. Diese Meßkammer hat die Vorteile, daß die Bad-perfusion im Kanal annähernd laminar ist, fast keinen Totraum beim Lösungswechsel vorhanden ist, die Referenzelektrode nah an der zu messenden Herzkapillare positioniert ist und gute optische Verhältnisse bietet. Oberhalb des Kanals befindet sich eine Rundfräsung, so daß keine Kanten vorhanden sind, an denen Tropfen hängen bleiben können.

Pipettenkapazität

Eine notwendige Voraussetzung für die Bestimmung der Membrankapazität ist die Kompensation der Pipettenkapazität. Bei allen von mir vorgenommenen Messungen wurde die Pipettenkapazität im cell-attached-Modus kompensiert. Dazu wurden die Stromtransienten als Folge einer Rechteckspannung (± 5 mV, Pulsdauer: 125 ms) minimiert, beim EPC-7 mit „C-Fast“ und beim Axopatch 200B mit der „pipette capacitance compensation“.

Membrankapazitäts-Bestimmung

Dieser Abschnitt soll die Methode verdeutlichen, die zur Kapazitätsbestimmung verwendet wurde. Die Stärke dieser Methode liegt vor allem darin, daß der/die AnwenderIn nicht nur einfach einen Meßwert für die Membrankapazität erhält, sondern auch sofort sieht, wie gut er/sie den Ganzzelleitmodus an einer Zelle etabliert hat. Zudem kann der/die AnwenderIn seine manuelle (zum Beispiel beim EPC-7 oder beim Axopatch 200B) oder die automatische (wie zum Beispiel beim EPC-9) Kapazitätskompensation überprüfen und bewerten. Es werden Spannungsrampen appliziert wie in Abbildung 3.1. Beim Wechsel der Rampen kommt es durch den Lade-Effekt zu einem instantanen Stromsprung. Dieser Stromsprung ist ein Maß für die Membrankapazität.

Allgemein gilt: Die Kapazität C läßt sich als Quotient aus Ladung Q und Spannung U ausdrücken. Das an der Membran abfallende Potential ist in der Regel nicht exakt bekannt, weil die Membran auch ohne ein extern angelegtes Potential aufgeladen sein kann und zusätzlich ein Diffusionspotential an der Pipettenspitze auftreten kann. Deswegen betrachtet man die differentielle Kapazität $C = dQ/dU$, und dies bedeutet für eine Spannungsrampe: $dU/dt = (dQ/dt)/C$. Da dQ/dt der Strom I ist, gilt $C = I/(dU/dt)$. Beim Wechsel einer Aufwärtsrampe von $+500$ mV/s zu einer Abwärtsrampe von -500 mV/s kommt es zu einem Spannungswechsel dU/dt von 1 V/s. Folglich bedeutet ein resultierender Stromsprung von 100 pA eine Kapazität von 100 pF. Das betrachtete dU/dt ist hierbei die Änderung des Spannungsabfalls über die Zellmembran. Wenn der Zugriffswiderstand R_z nicht wesentlich

kleiner ist als der Membranwiderstand R_m der abgeleiteten Zelle, muß der Spannungsabfall an der Membran U_m dahingehend korrigiert werden: $dU_m/dt = (dU/dt) * R_m/(R_m+R_z)$. Da bei den von mir gemessenen Herzkapillaren der Membranwiderstand immer mindestens 100mal höher als der Zugriffswiderstand war, wurde R_z vernachlässigt.

Die Stromsprünge wurden zum einen über ein Strom-Spannungs-Diagramm dargestellt und ausgemessen, er konnte aber auch über einen „standard least-square fit“ im Origin 5.0 ermittelt werden. Zwischen den beiden Auswertungen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Während der Messung konnte die Membrankapazität schnell anhand des Stromverlaufs auf ± 3 pF abgeschätzt werden. Diese Methode war nützlich zur Analyse der Qualität der Ganzzellstrommessung. Die Merkmale hierzu sind die Steilheit des Stromsprunges und der dann folgende Stromverlauf. Rechteckspannungssprünge, die zu exponentiell abklingenden Stromantworten führen – hier wird über die Stromamplitude I_0 und die Abklingzeit τ die Membrankapazität bestimmt ($\tau = R * C$ mit $R = U_0/I_0$) – sind für die sofortige Einschätzung der Qualität der Ganzzelleitung ungünstig.

Lucifer Yellow-Anfärbung

Mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Lucifer Yellow (L-0144, Sigma, Steinheim, Deutschland) wurden mittels konventioneller Ganzzelleitung die Kapillarfragmente angefärbt. Zur Pipettenlösung für die Ganzzelleitung wurden 0.5% Lucifer Yellow dazugegeben und mit Hilfe eines Ultraschallbades in Lösung gebracht. Bei der Füllung der Patchpipette wurde diese Lösung über ein 0.22 μ m Filtereinsatz (Millex-GS, Millipore, Bedford, USA) gefiltert. Nach der Etablierung des Seals wurde 10 Minuten lang der Ganzzellmodus aufrechterhalten. Während dieser Zeit wurde der Farbstoff nicht angeregt. Die Patchpipette wurde dann rasch aus dem Bad entfernt, und der Farbstoff wurde erst dann mit einer Quecksilberdampf-Lampe angeregt. Zur Anregung des Fluoreszenz-Farbstoffs wurde ein Filter verwendet, der zwischen 460 und 490 nm durchlässig ist. Die maximale Absorption von Lucifer Yellow liegt bei 426 nm, so daß mit diesem Filter nicht optimal angeregt wurde, aber diese teilweise Anregung reichte trotzdem völlig aus. Die Fluoreszenz-Emission – die maximale Emission von Lucifer Yellow liegt bei 531 nm – wurde über einen Filter, der die Wellenlängen von 515 bis 550 nm durchläßt, über die CCD-Kamera (KAM02E, EHD, Damme, Deutschland) aufgenommen. Mittels des „on-board frame-grabbers“ (PowerMacintosh 7500) und der exzellenten Software (NIH-Image 1.6.1) wurden die Bilder digitalisiert und abgespeichert. Um sicherzugehen, daß der

Farbstoff nicht doch noch weiter diffundierte, wurde die Fluoreszenz-Emission noch zweimal in 10 Minuten-Abständen über die CCD-Kamera aufgenommen.

Zusammensetzung der Salzlösung

Physiologische Salzlösung (5 mM K⁺):

135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na-Pyruvat, 10 mM Glukose und 10 mM HEPES; pH 7.4, eingestellt mit 1 M NaOH

Hoch-Kaliumlösung (140 mM K⁺)

140 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0.33 mM NaH₂PO₄, 2 mM Na-Pyruvat, 10 mM Glukose und 10 mM HEPES; pH 7.4, eingestellt mit 1 M NaOH

Pharmaka und Salze

Bis auf den Kaliumkanalöffner Rilmakalim (HOE234, Aventis, Frankfurt) sind alle verwendeten Salze und Pharmaka von Sigma (Steinheim, Deutschland).

Ergebnisse

Als erstes möchte ich kurz auf die Eigenschaften der präparierten Herzkapillaren eingehen, dann auf ihre passiven elektrischen Eigenschaften und schließlich auf die Ergebnisse zu den Untersuchungen ihres K_{ATP} -Stromes.

Die präparierten Herzkapillaren, eigentlich Teile bzw. Fragmente der Herzkapillaren, erwiesen sich als höchst schwierig zu messende Objekte. Hauptsächlich liegt dies daran, daß die Membranoberfläche nur teilweise frei von der Basalmembran ist. Eine weitere Schwierigkeit liegt darin, daß die Wände der Kapillaren extrem dünn sind (ca. $1\ \mu\text{m}$). Zudem ist die Fläche, auf der ein Seal etabliert werden kann, relativ klein (kleiner als $5\ \mu\text{m}$ im Durchmesser). Die höchste Erfolgsquote lag genau in der Mitte des Kernbereichs. Außerhalb des Kernbereichs konnte ich niemals ein Gigaseal erreichen.

Passive elektrische Eigenschaften

Da die zu messenden Kapillaren aus mehreren Zellen bestehen, wurden konventionelle Ganzzelleableitungen durchgeführt, um die Membrankapazität des Kapillarfragments genau zu bestimmen. Eine repräsentative Messung ist in Abbildung 3.1 dargestellt, bei der Spannungsrampen von -30 bis $-50\ \text{mV}$ appliziert worden sind, die eine Rampengeschwindigkeit von $500\ \text{mV s}^{-1}$ mit unterschiedlicher Polarität aufwiesen. Die durchschnittliche Kapazität war $19.9 \pm 1.0\ \text{pF}$ für 28 Kapillaren. Diese Kapillaren hatten einen Eingangswiderstand von $3.30 \pm 0.66\ \text{G}\Omega$, der eher eine untere Abschätzung darstellt, weil der durchschnittliche Abdichtwiderstand (Sealwiderstand) mit $60 \pm 12\ \text{G}\Omega$ nur 18mal größer war. Die 28 gemessenen Kapillarfragmente bestanden aus 2 bis 12 Endothelzellen. Es zeigte sich, daß die ermittelte Kapazität nicht mit der Zellanzahl des Kapillarfragments korrelierte (Korrelationsfaktor: 0.013, siehe Abbildung 3.2). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß Endothelzellen in den präparierten Kapillarfragmenten nicht elektrisch gekoppelt waren, so daß die ermittelte Kapazität der Membrankapazität einer einzelnen Endothelzelle entsprach. Bei zwei Kapillarfragmenten zeigte die Anfärbung mit Lucifer Yellow in der konventionellen Ganzzelleableitung, daß sich nur die abgeleitete Endothelzelle mit Lucifer Yellow dialysieren ließ. Genauer gesagt, benachbarte Zellkerne wurden nicht angefärbt (siehe Abbildung 3.3). Auch dieses Ergebnis unterstützt die Aussage, daß in der von mir gewählten Präparation keine Koppelung zwischen den kapillären Endothelzellen über gap junctions vorhanden waren.

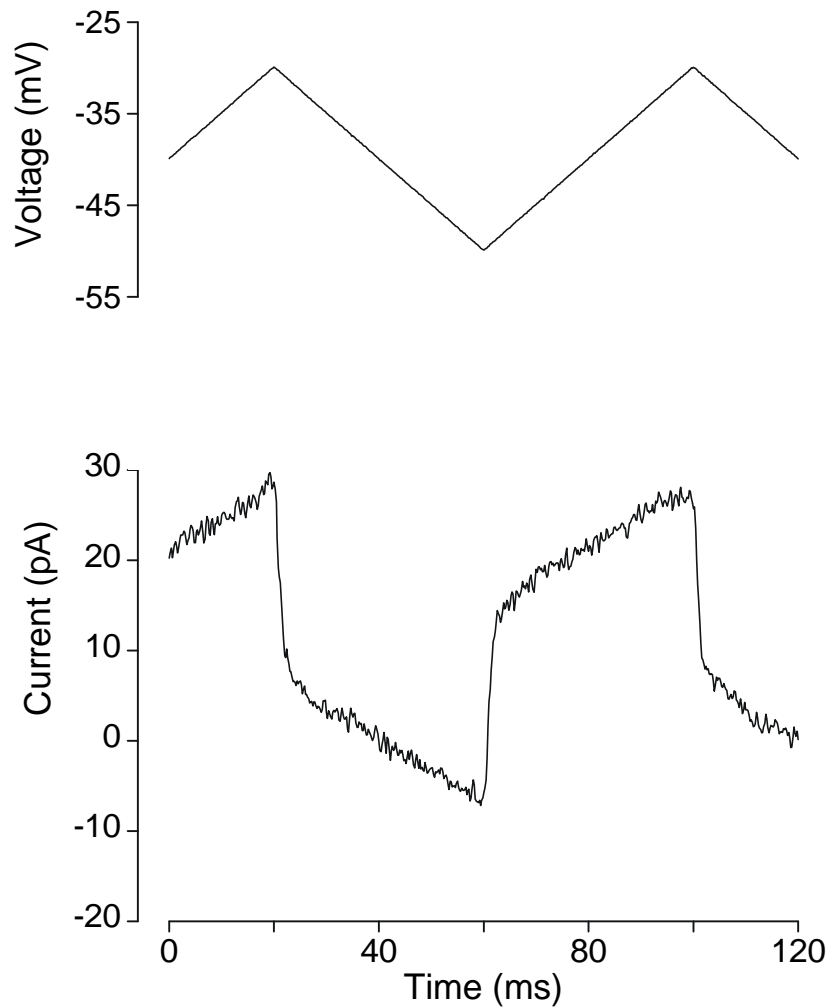


Abbildung 3.1

Membrankapazitäts-Bestimmung

Die obere Abbildung zeigt die applizierten Aufwärts- und Abwärtsrampen (500 mV s^{-1}) zwischen -30 und -50 mV im Spannungsklemm-Modus; die untere Abbildung gibt die Stromantwort einer vierzelligen Kapillare an. Ein Stromsprung von 21.2 pA ist beim Wechsel der Rampen $dV/dt = 1 \text{ V s}^{-1}$ vorhanden. Damit ergibt sich eine Membrankapazität von ca. 21 pF . Diese Ableitung hatte einen Sealwiderstand von $16.6 \text{ G}\Omega$ und einen Eingangswiderstand von $1.4 \text{ G}\Omega$.

Alle weiteren Untersuchungen sind mit der Perforated-Patch-Methode durchgeführt worden, um das intrazelluläre Milieu nicht zu beeinflussen. Ein im Stromklemm-Modus gemessener Membranpotentialverlauf ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Mit physiologischer Salzlösung (5 mM K^+) schwankte hier das Membranpotential zwischen -35 und -60 mV . Das durchschnittliche Ruhe-Membranpotential lag bei $-36.6 \pm 2.8 \text{ mV}$ von 31 im Perforated-Patch-Modus gemessenen Kapillaren. Bei Applikation von der Hochkalium-Lösung (140 mM

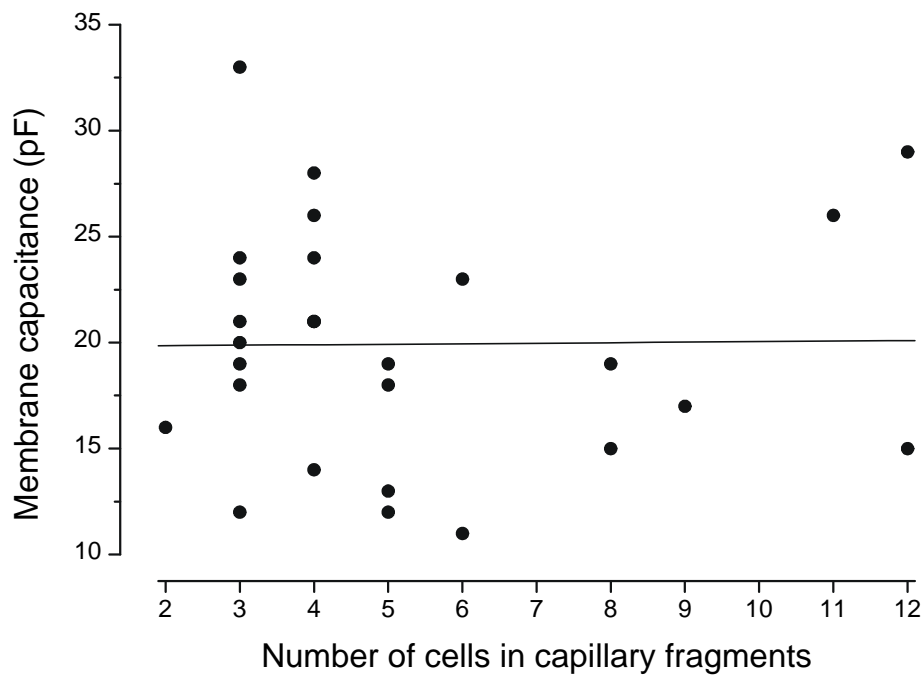


Abbildung 3.2

Die Membrankapazität von 28 Kapillarfragmenten mit unterschiedlicher Anzahl von Endothelzellen (2-12) ist dargestellt. Die ermittelten Membrankapazitäten lagen im Bereich von 11 pF bis 33 pF. Eine Korrelation zwischen Membrankapazität und Größe des Kapillarfragments (Anzahl der Zellen) war nicht feststellbar. Die abgebildete Regressionsgerade besaß einen Korrelationsfaktor von 0.013. Möglicherweise stellen die ermittelten Membrankapazitäten die Membrankapazität einer Endothelzelle dar.

K^+) depolarisierte das Membranpotential auf ca. 0 mV und die Membranpotentialschwankungen verringerten sich stark. Die Verringerung der Membranpotentialschwankungen läßt sich zum einen durch die Abnahme der treibenden Kraft für Kalium ($EMK \approx 0$) und zum anderen durch die Abnahme des Eingangswiderstandes der Zelle aufgrund der höheren Öffnungswahrscheinlichkeit von spannungsabhängigen Kanälen erklären. Abbildung 3.5 zeigt die dazugehörigen Strom-Spannungskurven, die durch langsame Spannungsrampen (40 mV s^{-1}) im Spannungsklemm-Modus ermittelt wurden. Die Kurve mit der physiologischen Salzlösung (5 mM K^+) zeigt eine Auswärtsgleichrichtung im Bereich von -60 bis $+35$ mV. Die durchschnittliche Leitfähigkeit (slope conductance) bei -55 mV von 31 Kapillaren lag bei 322 ± 50 pS. Hingegen weist die Kurve mit der Hoch-Kaliumlösung keine Auswärtsgleichrichtung auf und die durchschnittliche Leitfähigkeit bei -55 mV von 9 Kapillaren war mit 1446 ± 651 pS im Mittel 4.5fach höher. Das Umkehrpotential lag in der Nähe von 0 mV in einem Bereich von -2 bis $+3$ mV.

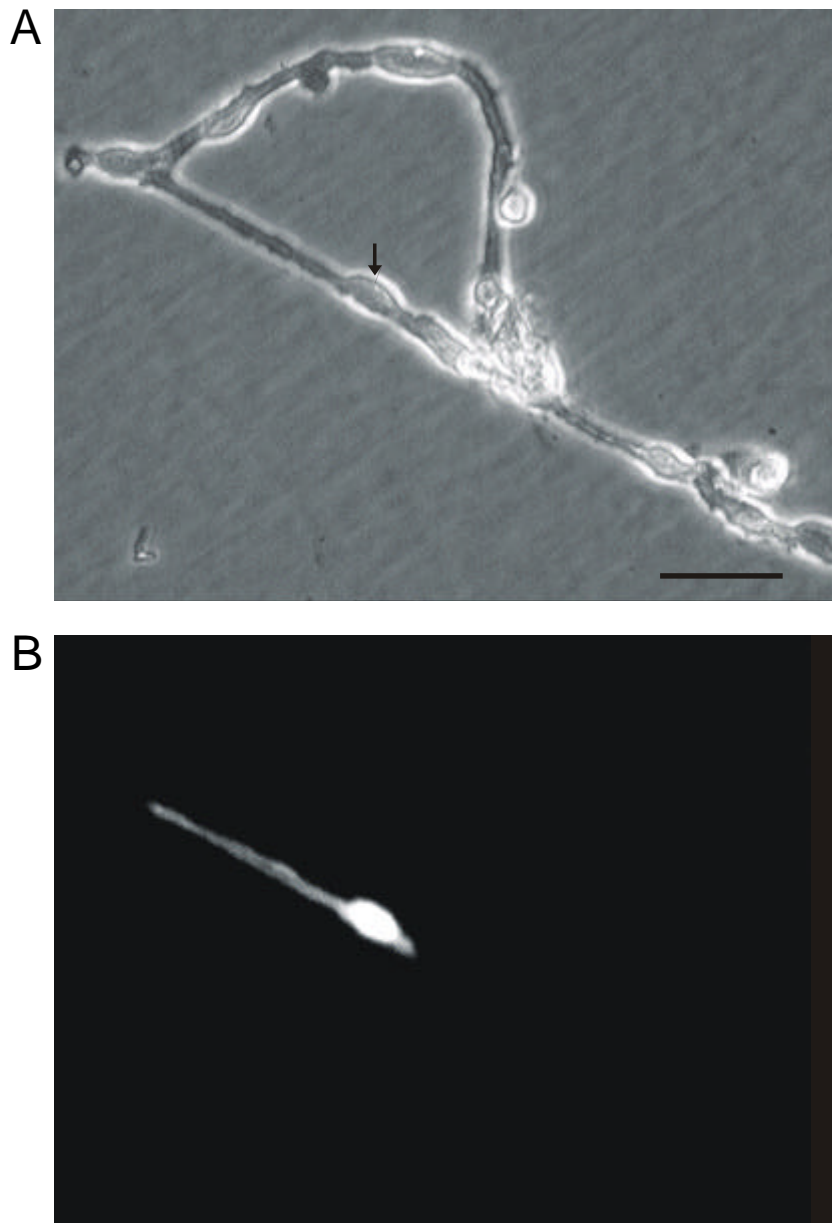


Abbildung 3.3

Lucifer Yellow Anfärbung

Abbildung A zeigt ein mindestens 9zelliges Kapillarfragment; der Pfeil weist auf den Kernbereich der Endothelzelle hin, auf den die Patchpipette abgesetzt worden ist; Meßbalken: 25 μm Abbildung B stellt die Emission von Lucifer Yellow dar, die Anfärbung geschah über eine mit Lucifer Yellow gefüllte Patchpipette in der konventionellen Ganzzellkonfiguration für 10 Minuten, nach weiteren 20 Minuten war keine Veränderung in der Anfärbung festzustellen. Benachbarte Endothelzellen im isolierten Kapillarfragment sind über gap junctions nicht angefärbt und damit nicht miteinander gekoppelt.

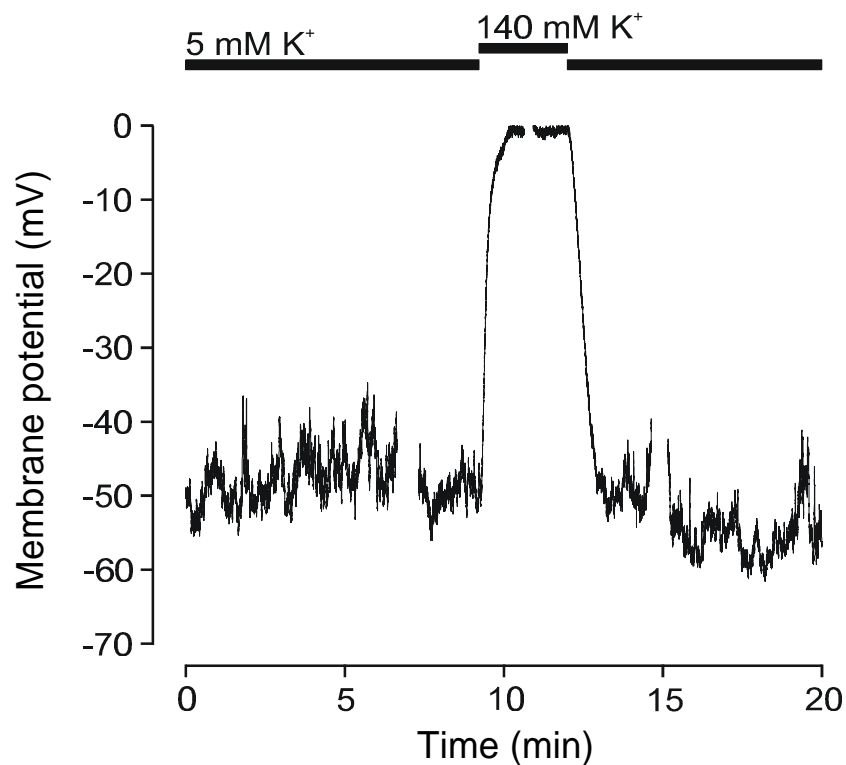


Abbildung 3.4

Membranpotentialverlauf bei Veränderung der extrazellulären Kaliumkonzentration

Dargestellt ist eine Perforated-Patch-Ableitung von einem fünfzelligen Kapillarfragment. In physiologischer Salzlösung (5 mM K⁺) schwankt hier das Membranpotential zwischen -35 und -60 mV. Bei 140 mM K⁺ (symmetrische Kaliumverhältnisse) depolarisiert es auf ca. 0 mV, und die Schwankungen des Membranpotentials verringern sich stark. Das Membranpotential ist in erster Linie von der extrazellulären Kaliumkonzentration abhängig.

K_{ATP}-Strom

Die typische Wirkung des Kaliumkanalöffners Rilmakalim auf das Membranpotential eines Kapillarfragments zeigt die Abbildung 3.6. Rilmakalim bewirkte eine Hyperpolarisation, die mit einer Verringerung der Membranpotentialschwankungen einherging, was mit der höheren Öffnungswahrscheinlichkeit der K_{ATP}-Kanäle zu erklären war. Bei den mit 1 μM Rilmakalim getesteten 9 Kapillaren lag das Ruhe-Membranpotential bei -38.0 ± 3.1 mV und mit 1 μM Rilmakalim bei -73.4 ± 1.7 mV. Abbildung 3.7 (Kurve mit gefüllten Kreis versehen) stellt beispielhaft die Wirkung von Rilmakalim auf die Strom-Spannungs-Beziehung dar. Auswärtsströme fanden sich positiv von -78 mV, negativ davon die Einwärtsströme. Diese Strom-Spannungs-Kurve ist über den Spannungsbereich von -100 bis +20 mV linear; eine Auswärtsgleichrichtung fehlt. Die Wirkung von 1 μM Rilmakalim konnte bei 5 Kapillaren

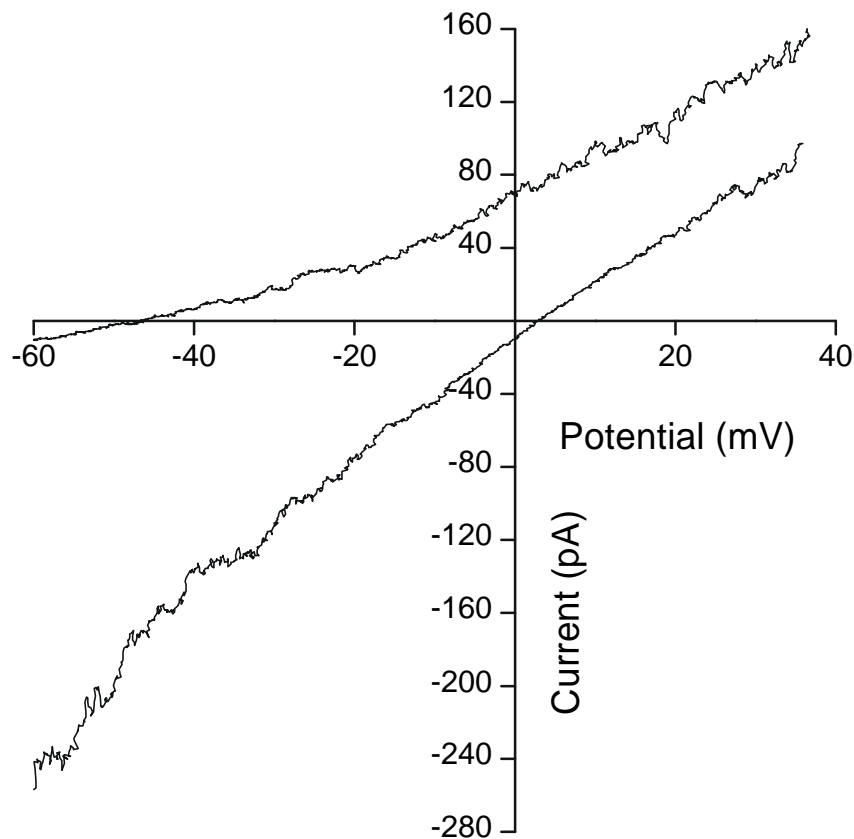


Abbildung 3.5

Wirkung der extrazellulären Kaliumkonzentration auf die Strom-Spannungs-Beziehung

Die obere Kurve stellt die Strom-Spannungs-Beziehung bei extrazellulären physiologischen 5 mM K^+ dar. Sie zeigt deutlich eine Auswärtsgleichrichtung. Hingegen zeigt die untere Kurve mit 140 mM extrazellulärem Kalium keine Auswärtsgleichrichtung. Beide Kurven sind mit der Perforated-Patch-Ableitung in der Spannungs-klemme mit langsamen Spannungsrampen von 40 mV s^{-1} gewonnen.

durch Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Glibenclamid komplett aufgehoben werden: Das Membranpotential depolarisierte auf den ursprünglichen Wert zurück (siehe Abbildung 3.6), und die Strom-Spannungs-Kurve wies wieder die ursprüngliche Auswärtsgleichrichtung auf. Die Differenzkurve (siehe Abbildung 3.7, unterer Graph) gibt den durch Rilmakalim induzierten Strom an. Hier lag das Umkehrpotential bei -85 mV ; Auswärtsströme befanden sich positiv, Einwärtsströme negativ davon. Bei 9 Kapillaren befand sich das durchschnittliche Umkehrpotential bei $-82.9 \pm 1.9 \text{ mV}$, das dem berechneten Kaliumgleichgewichtspotential von -84.8 mV sehr nahe kam. Im Bereich von -100 bis -40 mV war der Differenzstrom linear; positiv davon flachte er ab, und sein Rauschen nahm deutlich zu (siehe Diskussion ‚ K_{ATP} -Strom‘). Die Ab-

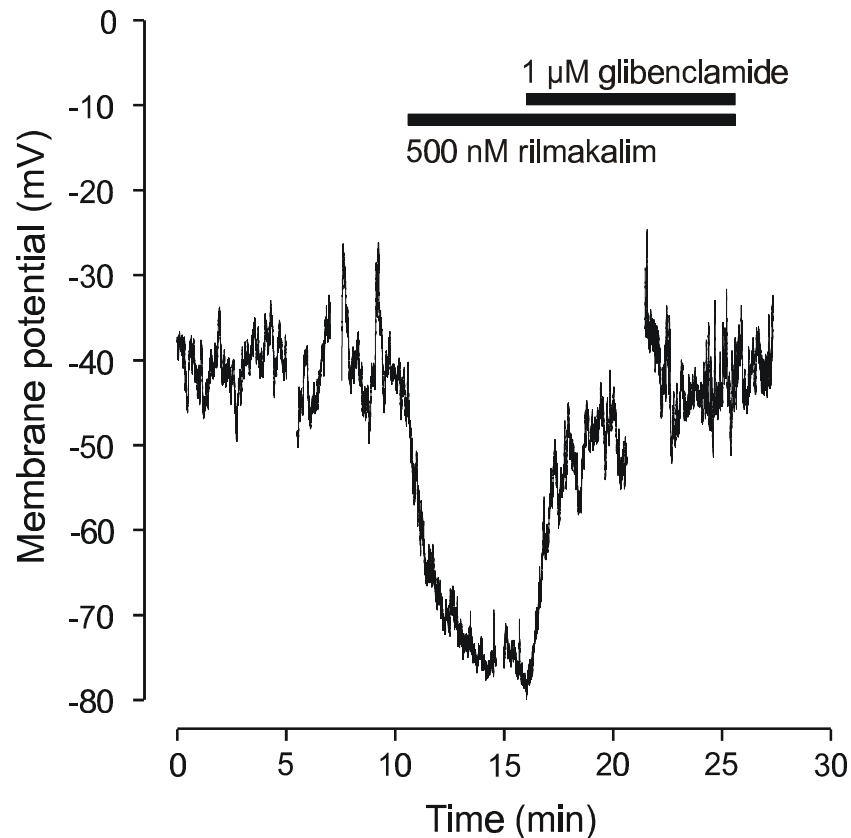


Abbildung 3.6

Wirkung von Rilmakalim und Glibenclamid auf das Membranpotential

Hier ist eine Perforated-Patch-Ableitung im Stromklemm-Modus gezeigt. Die Badapplikation von Rilmakalim (500 nM) hyperpolarisiert das Membranpotential stark – von ca. -40 auf -78 mV. Bei Zugabe von Glibenclamid in Anwesenheit von Rilmakalim depolarisiert das Membranpotential auf den vorherigen Zustand. Die Hyperpolarisation geht mit einer Verringerung der Membranpotentialschwankungen einher.

Abbildung 3.8 zeigt für den Kaliumkanalöffner Diazoxid die gleichen Effekte. Hier hatte die Kapillare eine größere Leitfähigkeit bei negativen Potentialen, so daß die Auswärtsgleichrichtung nicht so ausgeprägt war. Aber der Differenzstrom (siehe Abbildung 3.8, unterer Graph) ähnelte dem durch Rilmakalim verursachten Strom stark (siehe Abbildung 3.7, unterer Graph).

Die Öffnungswahrscheinlichkeit der K_{ATP} -Kanäle war von der ATP-Konzentration der Zelle abhängig. Eine Erhöhung in der Öffnungswahrscheinlichkeit konnte durch eine metabolische Hemmung erfolgen. Durch die metabolische Hemmung mit Desoxyglukose und Dinitrophenol wurde die glykolytische und mitochondriale ATP-Produktion gehemmt. Abbildung 3.9 stellt die Wirkung dieser metabolischen Hemmung auf die Strom-Spannungs-Kurve dar und zeigt, daß diese Wirkung mit der Wirkung der Kaliumkanalöffner vergleichbar ist.

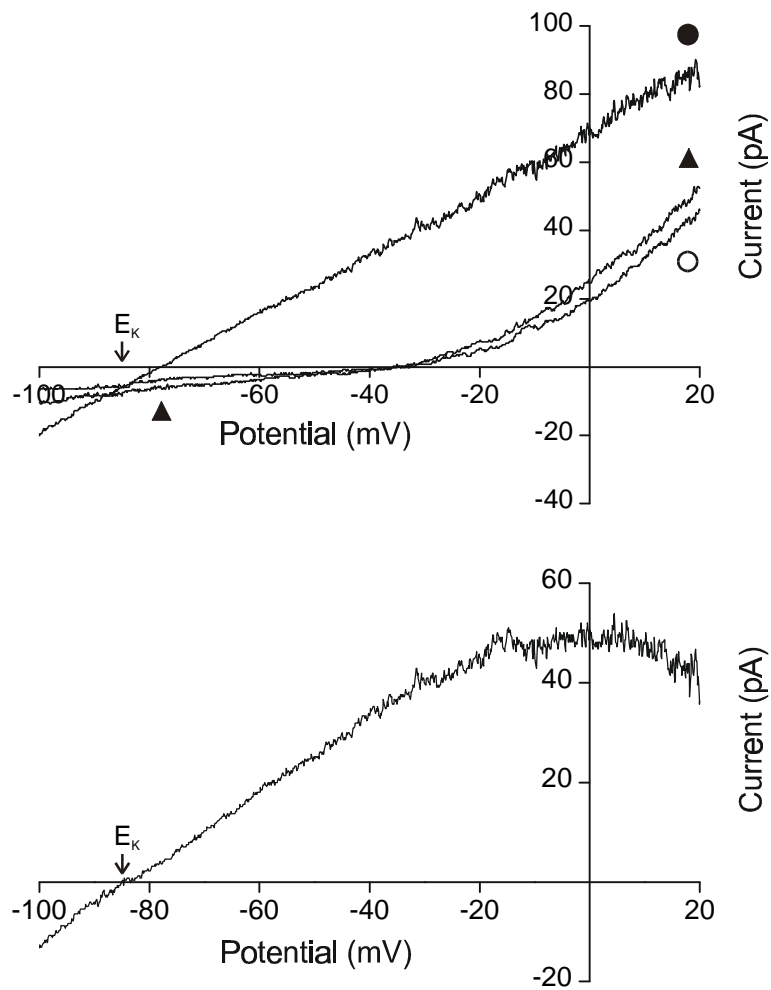


Abbildung 3.7

Wirkung von Rilimakalim und Glibenclamid auf die Strom-Spannungs-Beziehung

Der obere Graph zeigt drei Strom-Spannungs-Beziehungen, die am selben Kapillarfragment mit der Perforated-Patch-Methode gewonnen wurden. Dazu wurden langsame Spannungsrampen von 40 mV s^{-1} im Spannungsklemm-Modus appliziert. Die mit dem leeren Kreis markierte Kurve stellt die Strom-Spannungs-Beziehung unter Kontrollbedingungen dar, d.h. die Strom-Spannungs-Kurve ist vor der Applikation von Rilimakalim gewonnen. Die mit dem gefüllten Kreis versehene Kurve ist die Strom-Spannungs-Beziehung während der Applikation von $1 \mu\text{M}$ Rilimakalim. Die mit dem schwarzen Dreieck markierte Kurve zeigt die Strom-Spannungs-Beziehung unter Applikation von $1 \mu\text{M}$ Rilimakalim plus $1 \mu\text{M}$ Glibenclamid. Der Pfeil markiert das errechnete Kaliumgleichgewichtspotential (E_K). Unter $1 \mu\text{M}$ Rilimakalim findet sich eine Stromzunahme in Auswärts- wie Einwärts-Richtung gegenüber der Kontrollkurve und zudem weist eine deutliche Hyperpolarisation auf. Außerdem besitzt sie keine Auswärtsgleichrichtung wie die beiden anderen Kurven. Mit $1 \mu\text{M}$ Glibenclamid in Anwesenheit von $1 \mu\text{M}$ Rilimakalim konnte die Wirkung von Rilimakalim wieder rückgängig gemacht werden. Die Kreuzungspunkte mit der Rilimakalim-Kurve liegen in der Nähe von E_K . Der untere Graph stellt die Differenz zwischen der Kurve mit dem schwarzen gefüllten Kreis und der mit dem ungefüllten Kreis dar. Dieser Differenz-

strom ist der Strom, der durch das Rilimakalim verursacht wird. Der Differenzstrom besitzt die charakteristischen Eigenschaften des K_{ATP} -Stromes.

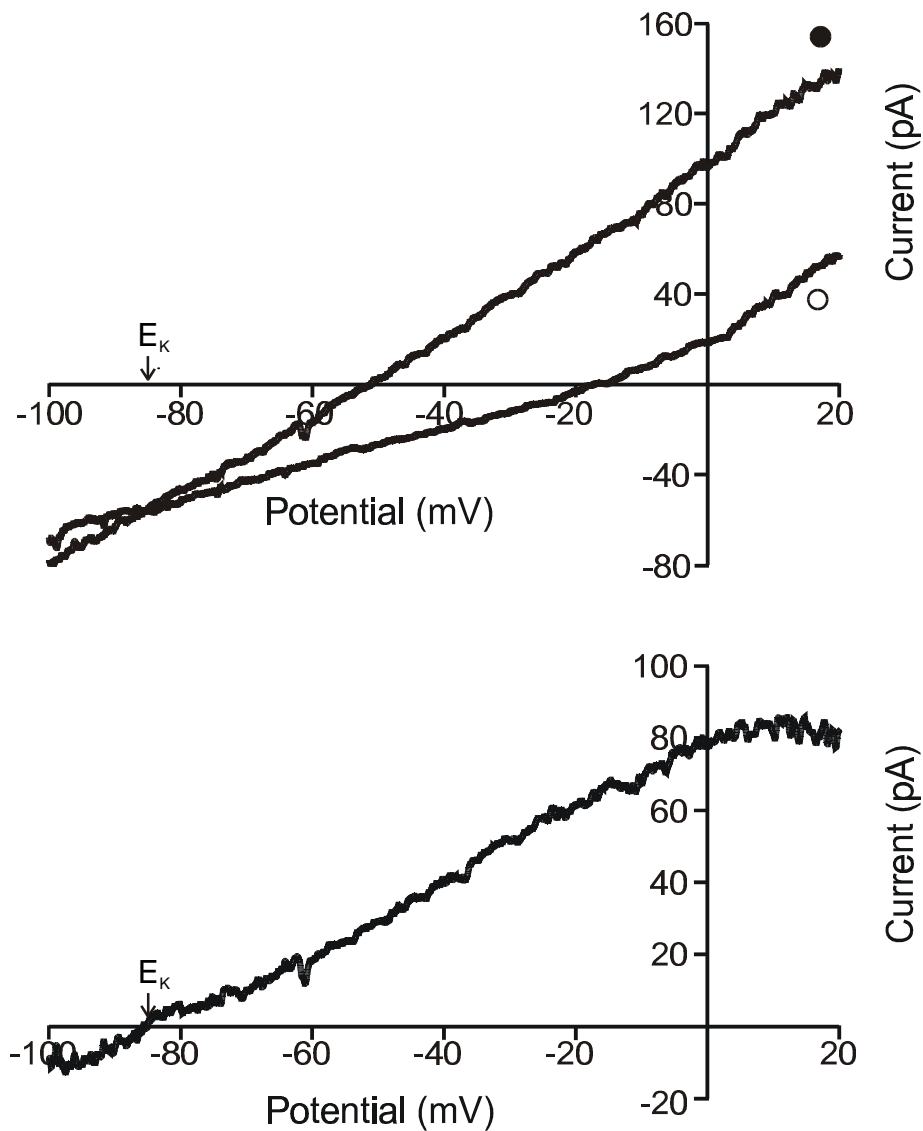


Abbildung 3.8

Wirkung von Diazoxid auf die Strom-Spannungs-Beziehung

Die Bezeichnungen für den oberen Graph sind analog zu der vorherigen Abbildung 3.7. Die hier abgeleitete Kapillare zeigt nicht eine ausgeprägte Auswärtsgleichrichtung, weil sie größere Leitfähigkeiten bei negativen Potentialen aufweist. Trotzdem bewirken 300 μM Diazoxid eine Stromzunahme in Auswärts- wie in Einwärts-Stromrichtung. Der untere Graph gibt wieder den Differenzstrom an und ähnelt stark dem durch Rilimakalim verursachten Strom.

Die Differenzkurve des durch die metabolische Hemmung induzierten Stroms ähnelt stark dem Differenzstrom, der durch die Kaliumkanalöffner verursacht wurde (vergleiche die unteren Graphen der Abbildungen 3.7 mit 3.8 und 3.9).

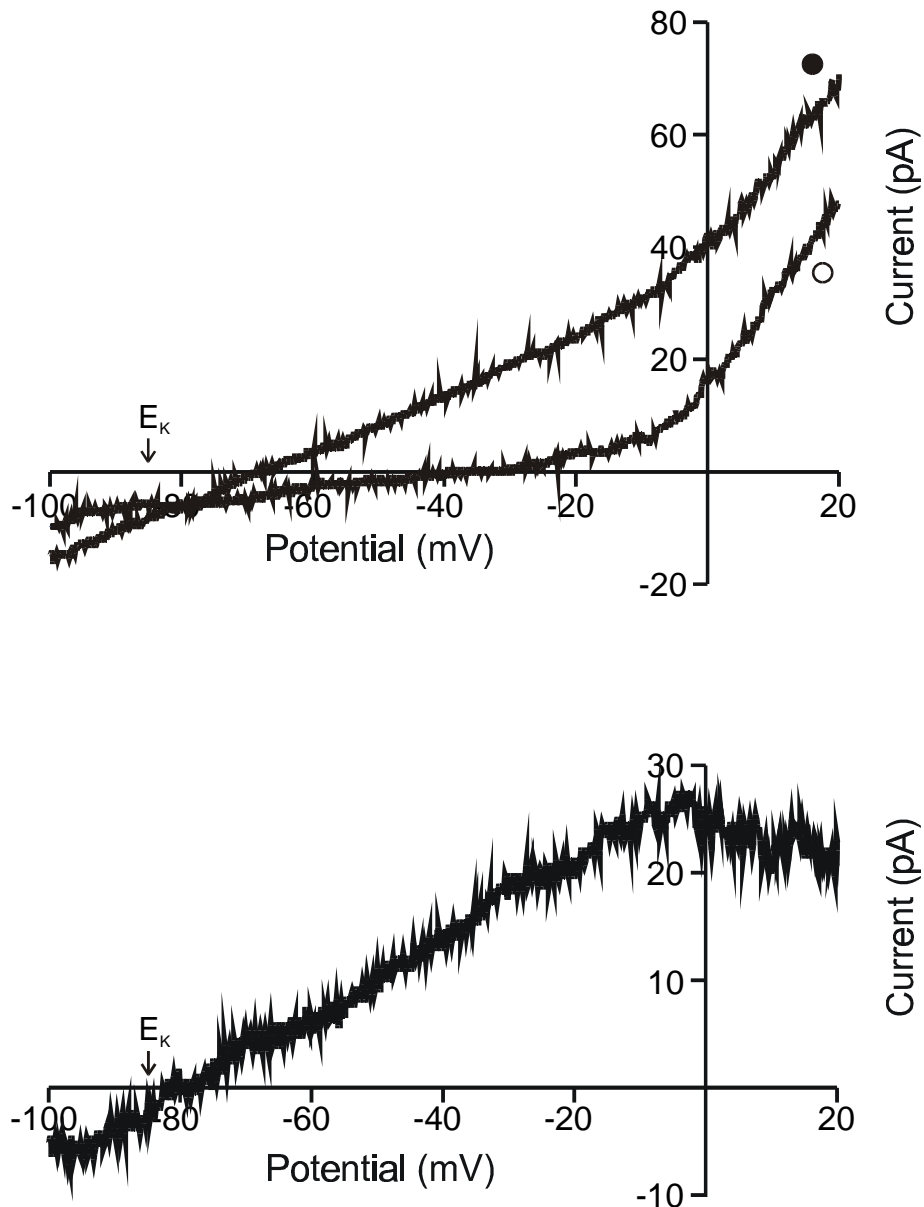


Abbildung 3.9

Der Effekt einer metabolischen Hemmung auf die Strom-Spannungs-Beziehung

Die Graphen dieser Abbildung stellen die Wirkung der metabolischen Hemmung durch 250 μM Dinitrophenol plus 10 mM Desoxyglukose auf die Strom-Spannungs-Beziehung dar. Die Beschriftung wird analog zu den vorherigen beiden Abbildungen beibehalten. Auch hier fällt auf, daß die beiden Kurven sich nahe dem berechneten E_K schneiden. Der untere Graph zeigt wiederum die Differenzkurve und verdeutlicht, daß die metabolische Hemmung einen Strom induziert, der dem Differenzstrom, der durch Kaliumkanalöffner verursacht wird, stark ähnelt.

Das Ergebnis, daß ein Strom durch die Kaliumkanalöffner induzierbar war, der sein Umkehrpotential nahe beim Kaliumgleichgewichtspotential hatte und durch Glibenclamid hemmbar war, legt nahe, daß Herzkapillaren K_{ATP} -Kanäle besitzen. Die Tatsache, daß eine

metabolische Hemmung zu einem sehr ähnlichen durch Kaliumkanalöffner verursachten Strom führte, bekräftigt, daß die endothelialen K_{ATP} -Kanäle in den Herzkapillaren funktionell sind.

Abbildung 3.10 zeigt den Vergleich der unterschiedlich starken Wirkungen von Hochkaliumlösung, Rilmakalim, Diazoxid und der metabolischen Hemmung. Anhand der Leit-

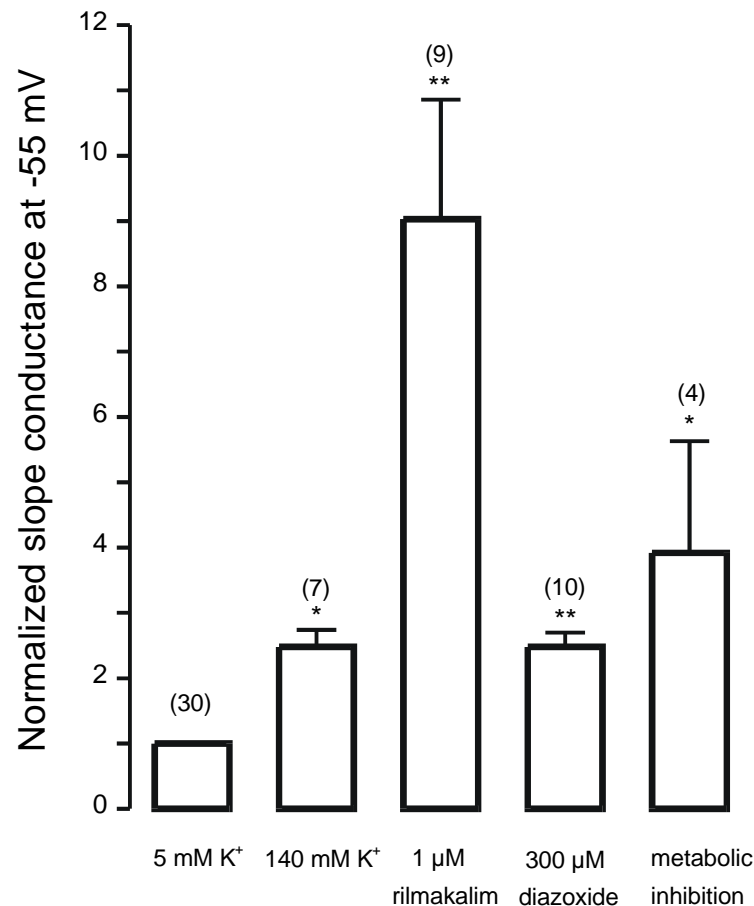


Abbildung 3.10

Vergleichende Darstellung der Wirkungen von Kaliumkanalöffnern und metabolischer Hemmung

Dargestellt sind die relativen Änderungen der Leitfähigkeit, bei -55 mV gemessen, bezogen auf die Leitfähigkeit in der physiologischen Badlösung (5 mM K^+) bei der gleichen Kapillare. Die eingeklammerten Zahlen geben die gemessenen Kapillarfragmente an. Die metabolische Hemmung wurde wieder mit 250 μ M Dinitrophenol plus 10 mM Desoxyglukose durchgeführt. Die Veränderungen der Leitfähigkeiten wurden mit Hilfe des ‚student’s paired t test‘ statistisch erfaßt; dabei gilt: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Auffällig ist hier, daß das Rilmakalim die Leitfähigkeit verneunfacht, während das Diazoxid sie nur mit einem Faktor von 2.5 erhöht. Das Rilmakalim wirkt als sehr potenter Kaliumkanalöffner an Herzkapillaren. Die von mir gewählte metabolische Hemmung verursacht fast eine Vervielfachung der Leitfähigkeit und liegt damit zwischen der Wirkung von Diazoxid und Rilmakalim.

fähigkeit bei -55 mV unmittelbar vor der jeweiligen Applikation in der physiologischen Salzlösung (5 mM K^+) und 3 Minuten nach Beginn der Applikation wurde der Wirkungunterschied als das Ausmaß der Leitfähigkeitsänderung ausgedrückt. Die relativen Änderungen in der Leitfähigkeit sind dargestellt. Im Mittel erhöhte 1 μ M Rilmakalim die Leitfähigkeit bei -55 mV um einen Faktor von 9.0 ± 1.8 ($N = 9$). Höhere Konzentration von Rilmakalim bewirkten keinen deutlich weiteren Anstieg in der Leitfähigkeit; es handelte sich bei dieser Konzentration um den annähernd maximalen Effekt. Um den Typ der K_{ATP} -Kanäle zu charakterisieren, wurde der Kaliumkanalöffner Diazoxid als klassifizierendes Pharmakon eingesetzt (siehe auch Diskussion ‚ K_{ATP} -Strom‘). Im Vergleich zu Rilmakalim ist die Wirkung von 300 μ M Diazoxid viel geringer. 400 μ M Diazoxid zeigten keinen weiteren Anstieg in der Leitfähigkeit ($N = 1$). Zudem wirkte die 400 μ M Konzentration schon stark zellschädigend. Im Mittel erhöhte 300 μ M Diazoxid die Leitfähigkeit bei -55 mV nur um einen Faktor von 2.5 ± 0.2 ($N = 10$) innerhalb der ersten 3 Minuten. Die Konzentrationen von 100 nM ($N = 2$) und 300 nM ($N = 3$) Diazoxid verursachten keine Änderung in der Leitfähigkeit. Die Wirkung auf die Leitfähigkeit bei -55 mV durch die metabolische Hemmung ist ebenfalls dargestellt. 250 μ M Dinitrophenol und 10 mM Desoxyglukose bewirken eine Erhöhung der Leitfähigkeit um den Faktor 3.9 ± 1.7 ($N = 4$). Höhere Konzentrationen von Dinitrophenol schädigten die Kapillarfragmente. Die Wirkung dieser niedrigen Konzentration von Dinitrophenol spiegelt eher die Situation in situ wieder.

Diskussion

Die in der Herz- bzw. Ventrikel- Suspension vorliegenden Kapillarfragmente lassen sich leicht von Herzmuskelzellen unterscheiden. Herzmuskelzellen sind quaderförmig und mit $120 \times 20 \times 5$ (L x B x H) μm sehr groß; zudem besitzen sie eine Querstreifung. Kapillaren bestehen aus aneinandergereihten Endothelzellen, die perlenschnurartig aussehen und keine Querstreifung aufweisen. Bei den präparierten Herzkapillaren waren die Abstände zwischen den Kernen der Endothelzellen unterschiedlich und lagen in einem Bereich von ca. 20 bis 60 μm . Die sehr selten gewonnenen Arteriolen besitzen neben den Endothelzellen noch glatte Muskelzellen, die ringförmig um die Endothelzellen angeordnet sind. Arteriolen sind mit 20 bis 50 μm im Durchmesser (Klieber & Daut, 1994) deutlich größer als die Herzkapillaren mit 6 μm . Somit waren Herzkapillarfragmente unter dem Mikroskop leicht zu identifizieren und gut von den anderen isolierten Objekten zu unterscheiden.

Aufgrund des fehlenden Perfusionsdrucks wiesen alle präparierten Kapillarfragmente ein kollabiertes Lumen auf. Zwischen den Kernen der Endothelzellen waren die Kapillaren im Durchmesser 2 bis 3 μm groß. Häufig war das kollabierte Lumen als dunkle Linie zwischen den Kernen (siehe Abbildung 1.1) zu sehen.

Herzkapillaren besitzen Perizyten (Tilton et al., 1979 a/b), aber im Gegensatz zu Gehirnkapillaren in einer viel geringeren Dichte (Tilton, 1991). Bei der Auswahl der Kapillaren wurde darauf geachtet, daß die Kapillarfragmente keine Perizyten besaßen. Besonders bei den 3 bis 5-zelligen Kapillaren gelang dies gut; längere Fragmente besaßen Perizyten. Außerdem weisen Perizyten nicht eine auswärtsgerichtete Strom-Spannungs-Beziehung auf wie das kapilläre Endothel, sondern eher eine lineare (Sakagami et al., 1999), so daß sich die beiden Zelltypen, wenn sie sich morphologisch gleichen, hierdurch unterscheiden lassen.

Kapazitätsmessung

Die Kapazitätsmessungen der unterschiedlich langen Herzkapillaren ergaben eine durchschnittliche Kapazität von ca. 20 pF. Da die gemessenen Kapazitäten nicht mit der Anzahl der Endothelzellen der Kapillaren korrelieren, bedeutet dies, daß die gemessene Kapazität der Membrankapazität der einzelnen Endothelzelle, die abgeleitet worden ist, entspricht. Das heißt, Endothelzellen in Herzkapillaren besitzen eine durchschnittliche Membrankapazität von 20 pF. Biologische Membranen haben eine spezifische Membrankapazität von $1 \mu\text{F cm}^{-2}$, so daß die durchschnittliche Membranfläche einer Endothelzelle von Herzkapillaren $20 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ groß ist. In erster Näherung läßt sich die Oberfläche einer kapillären Endothelzelle als

Zylinderhülse berechnen. Eine durchschnittliche Endothelzelle ist 30 μm lang und im Durchmesser 6 μm breit, was zu einer Membranfläche von $11.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ führt, die um den Faktor 1.8 kleiner ist als die Fläche aus der Kapazitätsbestimmung. Da die Membran der Endothelzellen Caveolae bilden, kommt es mit ca. 20 Caveolae ($\varnothing = 100 \text{ nm}$) pro μm^2 zu einer Oberflächenvergrößerung mit einem Faktor von 1.5 (McGuire & Twietmeyer, 1983). Dies unterstützt die Annahme, daß die Kapazitätsmessungen die Membrankapazität einer einzelnen Endothelzelle widerspiegeln. Außerdem bedeutet es, daß die Endothelzellen in den Kapillarfragmenten unter den zugrundegelegten experimentellen Bedingungen elektrisch nicht miteinander gekoppelt sind. Die wenigen Lucifer Yellow Anfärbungen zeigen dies bei gut erhaltenen Kapillarfragmenten ebenfalls, da der Fluoreszenz-Farbstoff nicht in die benachbarten Endothelzellen diffundiert. Hingegen könnten in vivo die kapillären Endothelzellen über gap junctions miteinander gekoppelt vorliegen. Auch mehrzellige Kapillarfragmente, aus dem Gehirn von Hausschweinen isoliert, besitzen eine Membrankapazität von 15 bis 25 pF (Hoyer et al., 1991), was zum einen darauf hindeutet, daß auch hier unter anderen experimentellen Bedingungen die gap junctions elektrisch entkoppelt sind, und zum anderen, daß kapilläre Endothelzellen aus verschiedenen Organen ähnlich große Zellmembranen besitzen.

Strom-Spannungs-Beziehung

Die unter physiologischen Bedingungen (5 mM K^+) gemessenen Strom-Spannungs-Kurven weisen alle eine Auswärtsgleichrichtung auf. Dieses Charakteristikum der Herzkapillaren fand sich auch bei Dittrich & Daut (1999). Auch die Stromamplituden und die Leitfähigkeiten stimmen überein. Ein Strom, der durch einen starken Einwärtsgleichrichter hervorgerufen wird, konnte nicht beobachtet werden.

K_{ATP} -Strom

Die Differenzkurven (Abbildungen 3.7 und 3.8) stellen den durch Kaliumkanalöffner induzierten Strom in Abhängigkeit zur Spannung dar und zeigen im physiologischen Spannungsbereich eine lineare bzw. ohmsche Abhängigkeit zwischen induziertem Strom und applizierter Spannung. Die schwache Spannungsabhängigkeit des K_{ATP} -Kanals (Kakei et al., 1985) drückt sich im physiologischen Spannungsbereich aus als lineare oder ohmsche Beziehung zwischen Strom und Spannung (Noma & Shibasaki, 1985). Diese Gemeinsamkeit und die Tatsache, daß das Umkehrpotential nahe dem Kaliumgleichgewichtspotential liegt (Noma, 1983), sprechen stark für die Existenz eines ATP-sensitiven Kalium-Stromes in den Herzka-

pillaren. Zudem zeigt der durch metabolische Hemmung induzierte Strom (Abbildung 3.9) die gleichen Eigenschaften und unterstützt die Behauptung, daß funktionelle K_{ATP} -Kanäle in Herzkapillaren vorhanden sind. Auch die Glibenclamid-Sensitivität des induzierten Stromes von $1 \mu\text{M}$ bestärkt dies – erst höhere Glibenclamid-Konzentrationen wirken unspezifisch (Szewczyk et al., 1997). Das höhere Stromrauschen und die Abflachung des Differenzstromes in positiver Richtung vom physiologischen Spannungsbereich (ausgeprägt in Abbildung 3.7 zu sehen) sind weitere Charakteristika für K_{ATP} -Ströme (Horie et al., 1987).

Um zu ermitteln, welche β -Untereinheit am K_{ATP} -Kanal der Herzkapillaren beteiligt ist, wurde der Kaliumkanalöffner Diazoxid verwendet. Diazoxid zeigt im Gegensatz zu anderen Kaliumkanalöffnern die größten Unterschiede in der Sensitivität der verschiedenen K_{ATP} -Kanaltypen. Der in den Herzmuskelzellen vorkommende K_{ATP} -Kanal (Kir6.2/SUR2A) ist Diazoxid-insensitiv, der in glatter Muskulatur (Kir6.1/SUR2B) und der in den β -Zellen der Bauchspeicheldrüse (Kir6.2/SUR1) hingegen sensitiv (Faivre & Findlay, 1989; Trube et al., 1986; Quale et al., 1995). Vor allem die Frage, welche SUR2-Komponente der K_{ATP} -Kanal in den Herzkapillaren besitzt, stand im Vordergrund. Diazoxid wirkte als Kaliumkanalöffner im Gegensatz zu Rilmakalim nur schwach. Dies läßt sich darauf zurückführen, daß Rilmakalim einer der potentesten Kaliumkanalöffner ist, der zur Zeit erhältlich ist. Die Diazoxid-Sensitivität der K_{ATP} -Kanäle in den Herzkapillaren zeigt klar, daß SUR2A nicht die beteiligte β -Untereinheit sein kann. SUR1 und SUR2B kommen also in Frage. Die zellspezifische RT-PCR ergab, daß nur SUR2B-Transkripte in Herzkapillaren vorkamen (Mederos y Schnitzler et al., 2000). Somit brauchte nicht noch der Kaliumkanalöffner Pinacidil zur Unterscheidung, ob SUR1 oder SUR2B als β -Untereinheit des K_{ATP} -Kanals vorliegen, eingesetzt werden. Nanomolare Konzentrationen von Diazoxid induzierten keinen K_{ATP} -Strom. Im Gegensatz dazu zeigten diese Konzentrationen (sogar 10 pM) bei Fluoreszenz-Messungen mit bis-Oxonol starke Hyperpolarisationen (Langheinrich & Daut, 1997). Dieser Widerspruch in der Diazoxid-Sensitivität der K_{ATP} -Kanäle von Herzkapillaren ist zur Zeit nicht geklärt. Einerseits ist es vorstellbar, daß durch die Bildung eines Gigaseals das Zytoskelett so stark deformiert wird, daß die K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran eine hypothetische Zytoskelett-Anbindung verlieren (siehe dazu Furukawa et al., 1996) und dadurch Diazoxid-insensitiv werden. Andererseits ist es denkbar, daß das in die Membran eingelagerte bis-Oxonol mit der SUR-Komponente in Wechselwirkung tritt. Es könnte zu einer Konformationsänderung der SUR-Untereinheit führen, die viel sensitiver für Diazoxid wäre.

Die metabolische Hemmung mit $250 \mu\text{M}$ Dinitrophenol und 10 mM Desoxyglukose aktivierte den K_{ATP} -Strom deutlich. Die Wirkung war nicht so stark wie die des potenten Kalium-

kanalöffners Rilmakalim, aber dennoch stärker als die von Diazoxid. Höhere Konzentrationen von Dinitrophenol schädigten die Kapillare schnell, und die Effekte konnten nicht wieder ausgewaschen werden. Bei der oben genannten Konzentration war dies möglich.

Die Anzahl der K_{ATP} -Kanäle einer Kapillarendothelzelle kann mit Hilfe der Ganzzellaufleitungen abgeschätzt werden. Bei -55 mV ist der Median der Leitfähigkeit unter der Applikation von Rilmakalim 900 pS. Unter der Annahme einer sehr hohen Öffnungswahrscheinlichkeit durch den potenten Kaliumkanalöffner ($1 \mu\text{M}$ Rilmakalim) ergeben sich für einen K_{ATP} -Kanal mit 33 pS 27 Kanäle pro Zelle und für einen K_{ATP} -Kanal mit 80 pS 11 Kanäle pro Zelle. Das bedeutet, daß die Anzahl der zu erwartenden K_{ATP} -Kanäle pro Kapillarendothelzelle zwischen 5 und 40 liegen kann.

Um die Leitfähigkeit des K_{ATP} -Kanals in Herzkapillaren zu bestimmen, wurden Ganzzellaufleitungen vorgenommen. Experimente im „cell-attached“- oder „cell-free“-Modus, die üblicherweise für eine Leitfähigkeitsbestimmung geeignet wären, sind in diesem Fall nicht sinnvoll, da die Kanaldichte zu gering ist. Zudem könnte es sein, daß die K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran nicht gleichmäßig verteilt vorliegen, sondern nur auf der luminalen Seite der Endothelzelle (Manabe et al., 1995) oder an den Grenzen zu den benachbarten Endothelzellen in der Kapillare vorkommen. Da Perforated-Patch-Ableitungen durch den erhöhten Zugriffs-widerstand ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis aufweisen als die konventionellen Ganzzellaufleitungen, entschied ich mich für den konventionellen Meßmodus. Jedoch öffneten sich unter verschiedenen von mir gewählten experimentellen Bedingungen (Pipettenlösungen und Klemmspannungen) mehrere Kanaltypen. Die ermittelten Leitfähigkeiten der aktivierten Kanäle lagen unter 50 pS. Dieses Ergebnis spricht eher dafür, daß der K_{ATP} -Kanal von Herzkapillaren als α -Untereinheit den Kir6.1 besitzt. Die aus Kir6.2-Komponenten bestehenden K_{ATP} -Kanäle besitzen in heterolog exprimierten Säugetierzellen Leitfähigkeiten von 76 , 79 und 80 pS (Inagaki et al., 1995c; Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996), während der aus Kir6.1 bestehende heterolog exprimierte K_{ATP} -Kanal 33 pS hat (Yamada et al., 1997). Da die Kir6.2-Untereinheiten, egal mit welcher SUR-Untereinheit sie kombiniert sind, Leitfähigkeiten von ca. 80 pS aufweisen, liegt es nahe zu behaupten, daß die α -Untereinheit die Leitfähigkeit des Kanals bestimmt. Wenn nicht starke synergistische Effekte bei der Kombination von Kir6.1 mit den drei bekannten SUR-Untereinheiten auftreten, müßten die aus Kir6.1 aufgebauten K_{ATP} -Kanäle ca. 30 pS in symmetrischen Kaliumlösungen besitzen. Die nativen K_{ATP} -Kanäle in der glatten Muskulatur von Blutgefäßen weisen unter symmetrischen Hoch-Kaliumlösungen Einzelkanalleitfähigkeiten im Bereich von 20 bis 50 pS auf (Quayle &

Standen, 1994). Möglicherweise sind also die K_{ATP} -Kanäle in der glatten Muskulatur die gleichen, die in den Herzkapillaren vorkommen.

Mit Hilfe der zellspezifischen RT-PCR konnten aber auch Transkripte der Kir6.2-Untereinheit in den Herzkapillaren gefunden werden. Das wiederum würde bedeuten, daß in den unternommenen Versuchen eine Einzelkanalleitfähigkeit von 80 pS vorhanden sein müßte. Dies konnte nicht beobachtet werden, schließt aber nicht eine solche Kanalleitfähigkeit aus, denn es sind bisher noch zu wenige Experimente erfolgreich durchgeführt worden. Vielleicht könnten immunhistochemische Methoden (bei denen Antikörper gegen die Kir-Untereinheit gerichtet werden) weiterhelfen, um herauszufinden, wo innerhalb der Kapillarendothelzelle die verschiedenen K_{ATP} -Kanäle vorliegen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, daß Herzkapillaren K_{ATP} -Kanäle besitzen. Damit kann die Aussage unterstützt werden, daß mikrovaskuläres Endothel funktionelle K_{ATP} -Kanäle exprimiert. Zum einen zeigten Damir Janigro und Marco A. Delpiano unabhängig voneinander einen ATP-sensitiven Kaliumstrom in kultivierten Endothelzellen von Gehirnkapillaren der Ratte (Janigro et al., 1992; Delpiano, 1994), und zum anderen konnte die Arbeitsgruppe von Heinz Gögelein bei frisch isolierten Gehirnkapillaren einen K_{ATP} -Strom nicht beobachten (mündliche Mitteilung, siehe auch Popp & Gögelein, 1992). Noch bis vor kurzem wurde davon ausgegangen, daß mikrovaskuläres Endothel aus dem Herzen keine K_{ATP} -Kanäle besitzt (Mehrke et al., 1991, siehe dazu Langheinrich & Daut, 1997). Ob bei anderen Kapillargebieten wie etwa der Niere oder der Leber K_{ATP} -Kanäle exprimiert werden, bleibt offen. Auch für das makrovaskuläre Endothel wird die Existenz der K_{ATP} -Kanäle noch kontrovers diskutiert: einerseits charakterisieren Christopher Katnik und David J. Adams (1995, 1997) in frisch dissoziierten Endothelzellen der Aorta und Lungenarterien des Kaninchens einen ATP-sensitiven Kaliumstrom, andererseits wiesen in Kultur gehaltenen Endothelzellen der Arbeitsgruppe von Bernd Nilius nie K_{ATP} -Ströme auf (mündliche Mitteilung von Bernd Nilius). Vermutlich verschwindet der K_{ATP} -Kanal unter Kultivierungsbedingungen, indem er nicht mehr exprimiert wird.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß funktionelle K_{ATP} -Kanäle in der Zellmembran von Herzkapillaren beim Meerschweinchen vorliegen, deren β -Untereinheit aus SUR2B und deren α -Untereinheit entweder aus Kir6.1, Kir6.2 oder aus beiden besteht (Mederos y Schnitzler et al., 2000).

Mögliche Funktion der K_{ATP} -Kanäle im Kapillarendothel

Es konnte in der Arbeitsgruppe von Jürgen Daut an Herzkapillarfragmenten gezeigt werden, daß eine Applikation von Kaliumkanalöffnern zu einem Anstieg des freien intrazellulären Kalziums führt (Langheinrich & Daut, 1997; Langheinrich et al., 1998). Die Konzentration des freien intrazellulären Kalziums hängt vom Gleichgewicht zwischen den Kalzium-Einströmen und -Ausströmen ab. Der Kalzium-Einstrom findet vermutlich über Kalzium-Leakage-Kanäle statt (Cannell & Sage, 1989; Laskey et al., 1992). Bei einer Hyperpolarisation, beispielsweise verursacht durch eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von K_{ATP} -Kanälen, kommt es zu einem vermehrten Kalzium-Einstrom, der, wenn der Kalzium-Ausstrom sich nicht gleichzeitig auch erhöht, zu einem Anstieg des freien intrazellulären Kalziums führt. Dieser Anstieg in den Kapillarendothelzellen beeinflusst die Permeabilität und die hydraulische Leitfähigkeit der Kapillarwand (Michel & Curry, 1999). Bisher ist die genaue Abfolge vom Kalzium-Anstieg zur kapillären Permeabilitätsänderung nicht bekannt. Es konnte aber gezeigt werden, daß es sich um eine durch Stickstoffmonoxid und zyklisches Guanosin-Monophosphat vermittelte Reaktion handelt (He et al., 1997; He et al., 1998). Die pathophysiologischen Zustände Ischämie und Hypoxie könnten im Kapillarendothel die gleiche Signalkaskade benutzen, indem sie die interzelluläre ATP- und ADP-Konzentration ändern, so daß sich K_{ATP} -Kanäle öffnen und eine starke Hyperpolarisation den erhöhten Kalzium-Einstrom bewirkt. Das dabei freigesetzte Stickstoffmonoxid des Kapillarendothels könnte die Kontraktilität der benachbarten Herzmuskelzellen beeinflussen (Brutsaert et al., 1998). Stickstoffmonoxid bewirkt eine Verringerung der Kontraktilität über zyklisches Guanosin-Monophosphat, das den L-Typ-Kalziumkanal hemmt (Brady et al., 1993; Mery et al., 1993). Zusätzlich kann das unter pathophysiologischen Bedingungen vermehrte Stickstoffmonoxid den Stoffwechsel der Mitochondrien dieser Herzmuskelzellen verändern (Kaasik et al., 1999; Loke et al., 1999). Auch die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel wird über Stickstoffmonoxid geregelt (Kosonen et al., 1999).

Welche Stimuli und in welchem Ausmaß die K_{ATP} -Kanäle unter physiologischen und pathophysiologischen Zuständen in den Herzkapillaren öffnen, ist nicht bekannt. Ich hoffe, die vorliegende Arbeit trägt dazu bei, daß weitere Untersuchungen über den Zusammenhang von endothelialen K_{ATP} -Kanälen und kapillärer Permeabilität unternommen werden.

Zusammenfassung

Bisher war es unklar, ob funktionelle ATP-sensitive Kaliumkanäle (K_{ATP} -Kanäle) in Endothelzellen existieren. An frisch isolierten Herzkapillaren in Meerschweinchen sprachen einige Indizien für die Existenz von K_{ATP} -Kanälen (Langheinrich & Daut, 1997).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten elektrophysiologischen Experimente zeigten, daß funktionelle K_{ATP} -Kanäle vorhanden sind. Folgende wichtige experimentelle Ergebnisse an Herzkapillaren wurden erhalten:

- Durch Kaliumkanalöffner konnte ein Strom induziert werden, der sein Umkehrpotential nahe beim Kaliumgleichgewichtspotential hatte.
- Dieser Strom ließ sich durch Glibenclamid, einen Kaliumkanalschließer, hemmen.
- Eine metabolische Hemmung führte zu einem sehr ähnlichen durch Kaliumkanalöffner verursachten Strom.
- Eine in einem normalen Konzentrationsbereich liegende Diazoxid-Sensitivität bestätigte, daß der in Herzmuskelzellen vorhandene K_{ATP} -Kanaltyp (Kir6.2/SUR2A) nicht in den Herzkapillaren vorkam.

Durch RT-PCR-Experimente konnte das Vorkommen der K_{ATP} -Kanäle in Herzkapillaren des Meerschweinchens untermauert werden. Es zeigte sich, daß diese K_{ATP} -Kanäle entweder aus Kir6.1/SUR2B oder Kir6.2/SUR2B zusammengesetzt sind.

Damit ist zum erstenmal an nativem mikrovaskulären Endothel das Vorkommen funktioneller K_{ATP} -Kanäle gezeigt worden. Diese Kanäle könnten eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Kapillarpermeabilität während einer Ischämie spielen.

Literatur

- Aguilar-Bryan, L., Nichols, Wechsler, W. W., Clement 4th, J. P., Boyd, A. E. 3rd, Gonzalez, G., Herrera-Sosa, H., Nguy, K., Bryan, J. & Nelson, D. A. (1995). Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* 268, 423-426.
- Ashcroft, S. J. & Ashcroft, F. M. (1990). Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* 2, 197-214.
- Barry, P. H. & Lynch, J. W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *Journal of Membrane Biology* 121, 101-117.
- Baukrowitz, T., Tucker, S. J., Schulte, U., Ruppertsberg, J. P. & Fakler, B. (1999). Inward rectification in K_{ATP} channels: a pH switch in the pore. *EMBO Journal* 18, 847-853.
- Beech, D. J. & Bolton, T. B. (1989). Properties of the cromakalim-induced potassium conductance in smooth muscle cells isolated from the rabbit portal vein. *British Journal of Pharmacology* 98, 851-864.
- Belles, B., Hescheler, J. & Trube, G. (1987). Changes of membrane currents in cardiac cells induced by long whole-cell recordings and tolbutamide. *Pflügers Archiv* 409, 582-588.
- Benndorf, K. (1995). Low-noise recording. In *Single-Channel Recording*, 2nd edn, ed. Sakmann, B. & Neher, E., pp. 129-145. Plenum Press, New York.
- Bokvist, K., Olsen, H. L., Hoy, M., Gotfredsen, C. F., Holmes, W. F., Buschard, K., Rorsman, P. & Gromada, J. (1999). Characterisation of sulphonylurea and ATP-regulated K⁺ channels in rat pancreatic A-cells. *Pflügers Archiv* 438, 428-436.
- Bonev, A. & Nelson, M. T. (1996). Vasoconstrictors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle through protein kinase C. *Journal of General Physiology* 108, 315-323.
- Brady, A. J., Warren, J. B., poole-Wilson, P. A., Williams, T. J. & Harding, S. E. (1993). Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *American Journal of Physiology* 265, H176-H182.
- Brutsaert, D. L., Fransen, P., Andries, L. J., De Keulenaer, G. W. & Sys, S. U. (1998). Cardiac endothelium and myocardial function. *Cardiovascular Research* 38, 281-290.

- Cannell, M. B. & Sage, S. O. (1989). Bradykinin-evoked changes in cytosolic calcium and membrane currents in cultured bovine pulmonary artery endothelial cells. *Journal of Physiology* 419, 555-568.
- Clement, J. P. 4th, Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L. & Bryan, J. (1997). Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron* 18, 827-838.
- Cook, D. L. & Hales, C. N. (1984). Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic B-cells. *Nature* 311, 271-273.
- Dart, C. & Standen, N. B. (1993). Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from pig coronary artery. *Journal of Physiology* 471, 767-786.
- Delpiano, M. A. (1994). Ionic currents on endothelial cells of rat brain capillaries. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 360, 183-186.
- Dittrich, M. & Daut, J. (1999). Voltage-dependent K(+) current in capillary endothelial cells isolated from guinea pig heart. *American Journal of Physiology* 277, H119-H127.
- Döring, H. J. & Dehnert, H. (1985). Das isolierte perfundierte Herz nach Langendorff. *Bioesstechnik-Verlag March GmbH* 5, 1-102.
- Eltze, M. (1989). Glibenclamide is a competitive antagonist of cromakalim, pinacidil and RP 49356 in guinea-pig pulmonary artery. *European Journal of Pharmacology* 165, 231-239.
- Englert, H. C., Wirth, K., Gehring, D., Furst, U., Albus, U., Scholz, W., Rosenkranz, B. & Scholkens, B. A. (1992). Airway pharmacology of the potassium channel opener, HOE 234, in guinea pigs: in vitro and in vivo studies. *European Journal of Pharmacology* 210, 69-75.
- Escande, D., Thuringer, D., Le Guern, S., Courteix, J., Laville, M. & Caverio, I. (1989). Potassium channel openers act through an activation of ATP-sensitive K⁺ channels in guinea-pig cardiac myocytes. *Pflügers Archiv* 414, 669-675.
- Escande, D., Thuringer, D., Leguern, S., Caverio, I. (1988). The potassium channel opener cromakalim (BRL 34915) activates ATP-dependent K⁺ channels in isolated cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 154, 620-625.
- Faivre, J. F. & Findlay, I. (1989). Effects of tolbutamide, glibenclamide and diazoxide upon action potentials recorded from rat ventricular muscle. *Biochimica et Biophysica Acta* 984, 1-5.

- Fosset, M., De Weille, J. R., Green, R. D., Schmid-Antomarchi H. & Lazdunski, M. (1988). Antidiabetic sulfonylureas control action potential properties in heart cells via high affinity receptors that are linked to ATP-dependent K⁺ channels. *Journal of Biological Chemistry* 263, 7933-7936.
- Frieden, M., Sollini, M. & Bény, J. (1999). Substance P and bradykinin activate different types of K_{Ca} currents to hyperpolarize cultured porcine coronary artery endothelial cells. *Journal of Physiology* 519, 361-371.
- Fujita, A. & Kurachi, Y. (2000). Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacology and Therapeutics* 85, 39-53.
- Furukawa, T., Yamane, T., Terai, T., Katayama, Y. & Hiraoka M. (1996). Functional linkage of the cardiac ATP-sensitive K⁺ channel to the actin cytoskeleton. *Pflügers Archiv* 431, 504-512
- Garrino, M. G., Plant, T. D. & Henquin, J. C. (1989). Effects of putative activators of K⁺ channels in mouse pancreatic beta-cells. *British Journal of Pharmacology* 98, 957-965.
- Gögelein, H., Hartung, J., Englert, H. C., Scholkens, B. A. (1998). HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP-sensitive potassium channel. Part I: effects on cardiomyocytes, coronary flow and pancreatic beta-cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286, 1453-1464.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv* 391, 85-100.
- Han, J., So, I., Kim, E. Y. & Earm, Y. E. (1993). ATP-sensitive potassium channels are modulated by intracellular lactate in rabbit ventricular myocytes. *Pflügers Archiv* 425, 546-548.
- He, P., Zhang, X. & Curry, F. E. (1996). Ca²⁺ entry through conductive pathway modulates receptor-mediated increase in microvessel permeability. *American Journal of Physiology* 271, H2377-H2387
- He, P., Liu, B. & Curry, F. E. (1997). Effect of nitric oxide synthase inhibitors on endothelial [Ca²⁺]_i and microvessel permeability. *American Journal of Physiology* 272, H176-H185.

- He, P., Zeng, M., & Curry, F. E (1998). cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of $[Ca^{2+}]_i$. *American Journal of Physiology* 274, H1865-H1874.
- Higgins, C. F. (1992). ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology* 8, 67-113
- Horie, M., Irisawa, H. & Noma A. (1987). Voltage-dependent magnesium block of adenosine-triphosphate-sensitive potassium channel in guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology* 387, 251-272.
- Horn, R. & Marty, A. (1988). Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *Journal of General Physiology* 92, 145-159.
- Hoyer, J., Popp, R., Meyer, J., Galla, H. J. & Gögelein H. (1991). Angiotensin II, vasopressin and GTP[γ -S] inhibit inward-rectifying K^+ channels in porcine cerebral capillary endothelial cells. *Journal of Membrane Biology* 123, 55-62.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P. IV., Namba, N., Inazawa, J., Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Seino, S. & Bryan, J. (1995a). Reconstitution of IK_{ATP} : An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science* 270, 1166-1170.
- Inagaki, N., Inazawa, J. & Seino, S. (1995b). cDNA sequence, gene structure, and chromosomal localization of human ATP-sensitive potassium channel, uKATP-1, gene (*KCNJ8*). *Genomics* 30, 102-104.
- Inagaki, N., Tsuura, Y., Namba, N., Masuda, K., Gono, T., Horie, M., Seino, Y., Mizuta, M. & Seino, S. (1995c). Cloning and functional characterization of a novel ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islets, pituitary, skeletal muscle, and heart. *Journal of Biological Chemistry* 270, 5691-5694.
- Inagaki, N., Gono, T., Clement, J. P., Wang, C. Z., Aguilar-Bryan, L., Bryan, J. & Seino, S. (1996). A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^+ channels. *Neuron* 16, 1011-1017.
- Isenberg, G. & Klockner, U. (1982). Calcium tolerant ventricular myocytes prepared by preincubation in a "KB medium". *Pflügers Archiv* 395, 6-18.
- Isomoto, S., Kondo, C., Yamada, M., Matsumoto, S., Higashiguchi, O., Horio, Y., Matsuzawa, Y. & Kurachi, Y. (1996). A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth

- muscle type ATP-sensitive K⁺ channel. *Journal of Biological Chemistry* 271, 24321-24324.
- Isomoto, S. & Kurachi, Y. (1997). Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 8, 1431-1446.
- Jacob, R (1991). Calcium oscillations in endothelial cells. *Cell Calcium* 12, 127-134.
- Jan, L. Y. & Jan, Y. N. (1994). Potassium channels and their evolving gates. *Nature* 371, 119-122
- Janigro, D., West, G. A., Gordon, E. L. & Winn, H. R. (1993). ATP-sensitive K⁺ channels in rat aorta and brain microvascular endothelial cells. *American Journal of Physiology* 265, C812-C821.
- Kaasik, A., Minajeva, A., De Sousa, E., Ventura-Clapier, R. & Veksler, V. (1999). Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. *FEBS letters* 444, 75-77.
- Kakei, M., Noma, A. & Shibasaki, T. (1985). Properties of adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology* 363, 441-462.
- Kakei, M., Yoshinaga, M., Saito, K. & Tanaka, H. (1986). The potassium current activated by 2-nicotinamidoethyl nitrate (nicorandil) in single ventricular cells of guinea pigs. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 229, 331-343.
- Kamouchi, M. & Kitamura, K. (1994). Regulation of ATP-sensitive K⁺ channels by ATP and nucleotide diphosphate in rabbit portal vein. *American Journal of Physiology* 266, H1687-H1698.
- Katnik, C & Adams, D. J. (1995). An ATP-sensitive potassium conductance in rabbit arterial endothelial cells. *Journal of Physiology* 485, 595-606.
- Katnik, C & Adams, D. J. (1997). Characterization of ATP-sensitive potassium channels in freshly dissociated rabbit aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology* 272, H2507-H2511.
- Kim, D. & Duff, R. A. (1990). Regulation of K⁺ channels in cardiac myocytes by free fatty acids. *Circulation Research* 67, 1040-1046.

- Kleppisch, T. & Nelson, M. (1995). Adenosine activates ATP-sensitive potassium channels in arterial myocytes via A_2 receptors and cAMP-dependent protein kinase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 92, 12441-12445.
- Klieber, H. G. & Daut, J. (1994). A glibenclamide sensitive potassium conductance in terminal arterioles isolated from guinea pig heart. *Cardiovascular Research* 28, 823-830.
- Korn, S. J. & Horn, R. (1989). Influence of sodium-calcium exchange on calcium current rundown and the duration of calcium-dependent chloride currents in pituitary cells, studied with whole cell and perforated patch recording. *Journal of General Physiology* 94, 789-812.
- Korn, S. J., Marty, A., Connor, J. A. & Horn, R. (1991). Perforated patch recording. *Methods in Neurosciences* 4, 364-373.
- Kosonen, O., Kankaanranta, H., Malo-Ranta, U. & Moilanen, E. (1999). Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. *European Journal of Pharmacology* 382, 111-117.
- Kozlowski, R. Z., Hales, C. N. & Ashford M. L. (1989). Dual effects of diazoxide on ATP- K^+ currents recorded from an insulin-secreting cell line. *British Journal of Pharmacology* 97, 1039-1050.
- Kubo, M., Quayle, J. M. & Standen, N. B. (1997). Angiotensin II inhibition of ATP-sensitive K^+ channels in rat arterial smooth muscle cells through protein kinase C. *Journal of Physiology* 503, 489-496.
- Langendorff, O. (1895). Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Pflügers Archiv* 61, 291-332
- Langheinrich, U. & Daut, J. (1997). Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K^+ channel openers and glucose deprivation. *Journal of Physiology* 502, 397-408.
- Langheinrich, U., Mederos y Schnitzler, M. & Daut, J. (1998). Ca^{2+} transients induced by K_{ATP} -channel opening in isolated coronary capillaries. *Pflügers Archiv* 435, 435-438.
- Laskey, R. E., Adams, D. J., Cannell, M. & van Breemen, C. (1992). Calcium entry-dependent oscillations of cytoplasmic calcium concentration in cultured endothelial cell monolayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 89, 1690-1694.

- Lebrun, P., Antoine, M. H., Hermann, M. & Herchuelz, A. (1991). RP 49356: inhibitory effects of ionic and secretory events in rat pancreatic islets. *European Journal of Pharmacology* 200, 159-161.
- Loke, K. E., McConnell, P. I., Tuzman, J. M., Shesely, E. G., Smith, C. J., Stackpole, C. J., Thompson, C. I., Kaley, G., Wolin, M. S. & Hintze, T. H. (1999). Endogenous endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide is a physiological regulator of myocardial oxygen consumption. *Circulation Research* 84, 840-845.
- Manabe, K., Ito, H., Matsuda, H., Noma, A. & Shibata, Y. (1995). Classification of ion channels in the luminal and abluminal membranes of guinea-pig endocardial endothelial cells. *Journal of Physiology* 484, 41-52
- Marchenko, S. M. & Sage, S. O. (1993). Electrical properties of resting and acetylcholine-stimulated endothelium in rat aorta. *Journal of Physiology* 462, 735-751.
- Matsuo, M., Kioka, N., Amachi, T. & Ueda K. (1999). ATP binding properties of the nucleotide-binding folds of SUR1. *Journal of Biological Chemistry* 274, 37479-37482.
- McGahren, E. D., Beach, J. M., & Duling, B. R. (1998). Capillaries demonstrate changes in membrane potential in response to pharmacological stimuli. *American Journal of Physiology* 274, H60-H65.
- McGuire, P. G. & Twietmeyer, T. A. (1983). Morphology of rapidly frozen aortic endothelial cells. Glutaraldehyde fixation increases the number of caveolae. *Circulation Research* 53, 424-429.
- Mederos y Schnitzler, M., Derst, C., Daut, J. & Preisig-Müller, R. (2000). ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *Journal of Physiology* 525, 307-317
- Mehrke, G. & Daut, J. (1990). The electrical response of cultured guinea-pig coronary endothelial cells to endothelium-dependent vasodilators. *Journal of Physiology* 430, 251-272.
- Mehrke, G., Pohl, U. & Daut, J. (1991). Effects of vasoactive agonists on the membrane potential of cultured bovine aortic and guinea-pig coronary endothelium. *Journal of Physiology* 439, 277-299.
- Mery, P. F., Pavoine, C., Belhassen, L., Pecker, F. & Fischmeister, R. (1993). Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated

- phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *Journal of Biological Chemistry* 268, 26286-26295.
- Michel, C. C. & Curry, R. E. (1999). Microvascular permeability. *Physiological Reviews* 79, 703-761.
- Neher, E. (1992). Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. In *Methods in Enzymology*, Volume 207, pp. 123 –131, *Ion Channels*, ed. B. Rudy and L. E. Iverson. Academic Press, San Diego.
- Nichols, C. G., Shyng, S. L., Nestorowicz, A., Glaser, B., Clement, J. P. 4th, Gonzalez, G., Aguilar-Bryan, L., Permutt, M. A. & Bryan, J. (1996) Adenosine diphosphate as an intracellular regulator of insulin secretion. *Science* 272, 1785-1787.
- Niki, I., Kelly, R. P., Ashcroft, S. J. & Ashcroft, F. M. (1989). ATP-sensitive K-channels in HIT T15 beta-cells studied by patch-clamp methods, ⁸⁶Rb efflux and glibenclamide binding. *Pflügers Archiv* 415, 47-55.
- Nilius, B., Viana, F. & Droogmans, G. (1997). Ion channels in vascular endothelium. *Annual Reviews of Physiology* 59, 145-170.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147-148.
- Noma, A. & Shibasaki, T. (1985). Membrane current through adenosine-triphosphate-regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *Journal of Physiology* 363, 463-480.
- Ohno-Shosaku, T., Zünkler B. J. & Trube, G. (1987). Dual effects of ATP on K⁺ currents of mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Archiv* 408, 133-138.
- Okuyama, Y., Yamada, M., Kondo, C., Satoh, E., Isomoto, S., Shindo, T., Horio, Y., Kitakaze, M., Hori, M. & Kurachi, Y. (1998). The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complex K⁺ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells. *Pflügers Archiv* 435, 595-603
- Popp, R. & Gögelein, H. (1992). A calcium and ATP sensitive nonselective cation channel in the antiluminal membrane of rat cerebral capillary endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1108, 59-66.
- Preisig-Müller, R., Mederos y Schnitzler, M., Derst, C. & Daut, J. (1999a). K_{ATP} channels in guinea-pig heart: Which subunits are expressed in cardiomyocytes and coronary endothelial cells? *Pflügers Archiv* 437 (Suppl.), R85.

- Preisig-Müller, R., Derst, C., Mederos y Schnitzler, M. & Daut, J. (1999b). Expression of the Kir2.0 family and K_{ATP}-channels in cardiomyocytes and coronary endothelial cells. *The Physiologist* 42, A1.
- Preisig-Müller, R., Mederos y Schnitzler, M., Derst, C. & Daut, J. (1999c). Separation of cardiomyocytes and coronary endothelial cells for cell-specific RT-PCR. *American Journal of Physiology* 277, H413-H416.
- Quayle, J. M., Bonev, A. D., Brayden, J. E. & Nelson, M. T. (1994). Calcitonin gene-related peptide activated ATP-sensitive K⁺ currents in rabbit arterial smooth muscle via protein kinase A. *Journal of Physiology* 475, 9-13.
- Quayle, J. M., Bonev, A. D., Brayden, J. E. & Nelson, M. T. (1995). Pharmacology of ATP-sensitive K⁺ currents in smooth muscle cells from rabbit mesenteric artery. *American Journal of Physiology* 269, C1112-C1118.
- Quale, J. M. & Standen, N. B. (1994). K_{ATP} channels in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Research* 28, 797-804.
- Rae, J., Cooper, K., Gates, P. & Watsky, M. (1991). Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *Journal of Neuroscience Methods* 37, 15-26.
- Rajan, A. S., Aguilar-Bryan, L., Nelson, D. A., Nichols, C. G., Wechsler, S. W., Lechago, J., & Bryan, J. (1993). Sulfonylurea receptors and ATP-sensitive K⁺ channels in clonal pancreatic alpha cells. Evidence for two high affinity sulfonylurea receptors. *Journal of Biological Chemistry* 268, 15221-15228.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu, G., Preisig-Müller, R., Daut, J., Karschin, A. & Derst, C. (2000). TASK-3, a novel tandem pore-domain acid-sensitive K⁺ channel: An extracellular histidine as pH sensor. *Journal of Biological Chemistry* 275, 16650-16657.
- Ronner, P., Matschinsky, F. M., Hang, T. L., Epstein, A. J. & Buettger, C. (1993). Sulfonylurea-binding sites and ATP-sensitive K⁺ channels in alpha-TC glucagonoma and beta-TC insulinoma cells. *Diabetes* 42, 1760-1772.
- Sakagami, K., Wu, D. M. & Puro, D. G. (1999). Physiology of rat retinal pericytes: modulation of ion channel activity by serum-derived molecules. *Journal of Physiology* 521, 637-650.
- Satoh, E., Yamada, M., Kondo, C., Repunte, V. P., Horio, Y., Iijima, T. & Kurachi, Y. (1998). Intracellular nucleotide-mediated gating of SUR/Kir6.0 complex potassium channels

- expressed in a mammalian cell line and its modification by pinacidil. *Journal of Physiology* 511, 663-674
- Senior, A. E., al-Shawi, M. K. & Urbatsch, I. L. (1995). The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Letters* 377, 285-289.
- Shyng, S. & Nichols, C. G. (1997). Octameric stoichiometry of the K_{ATP} channel complex. *Journal of General Physiology* 110, 655-664.
- Standen, N. B., Quayle, J. M., Davies, N. W., Brayden, J. E., Huang, Y. & Nelson, M. T. (1989). Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science* 245, 177-180.
- Szewczyk, A., Czyz, A. & Nalecz M. J.(1997). ATP-regulated potassium channel blocker, glibenclamide, uncouples mitochondria. *Polish Journal of Pharmacology* 49, 49-52
- Tanabe, K., Tucker, S. J., Matsuo, M., Proks, P., Ashcroft, F. M., Seino, S., Amachi, T. & Ueda, K. (1999). Direct photoaffinity labeling of the Kir6.2 subunit of the ATP-sensitive K⁺ channel by 8-azido-ATP. *Journal of Biological Chemistry* 274, 3931-3933.
- Tanabe, K., Tucker, S. J., Ashcroft, F. M., Proks, P., Kioka, N., Amachi, T. & Ueda, K. (2000). Direct photoaffinity labeling of Kir6.2 by [gamma-(32)P]ATP-[gamma]4-azidoanilide. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 272 , 316-319.
- Terzic, A., Jahangir, A. & Kurachi, Y. (1994). HOE-234, a second generation K⁺ channel opener, antagonizes the ATP-dependent gating of cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 268, 818-825.
- Tilton, R. G., Kilo, C. & Williamson, J. R. (1979a). Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvascular Research* 18, 325-335.
- Tilton, R. G., Kilo, C., Williamson, J. R. & Murch, D. W. (1979b). Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvascular Research* 18, 336-352.
- Tilton, R. G. (1991). Capillary pericytes: perspectives and future trends. *Journal of Electron Microscopy Technique* 19, 327-344.
- Trapp, S., Proks, P., Tucker, S. J. & Ashcroft, F. M. (1998). Molecular analysis of ATP-sensitive K channel gating and implications for channel inhibition by ATP. *Journal of General Physiology* 112, 333-349.
- Trube, G. & Hescheler, J. (1984). Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. *Pflügers Archiv* 401, 178-184.

- Trube, G., Rorsman, P. & Ohno-Shosaku, T. (1986). Opposite effects of tolbutamide and diazoxide on the ATP-dependent K⁺ channel in mouse pancreatic beta-cells. *Pflügers Archiv* 407, 493-499
- Tucker, S. J., Gribble, F.M., Zhao, C., Trapp, S. & Ashcroft, F. M. (1997). Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulphonylurea receptor. *Nature* 387, 179-183.
- Tucker, S. J., Gribble, F. M., Proks, P., Trapp, S., Ryder, T. J., Haug, T., Reimann, F. & Ashcroft, F. M. (1998). Molecular determinants of KATP channel inhibition by ATP. *EMBO Journal* 17, 3290-3296.
- Tusnády, G.E., Bakos, É., Váradi, A. & Sarkadi B. (1997). Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. *FEBS Letters* 402, 1-3.
- Ueda, K., Inagaki, N. & Seino, S. (1997) MgADP antagonism to Mg²⁺-independent ATP binding of the sulphonylurea receptor SUR1. *Journal of Biological Chemistry* 272, 22983-22986.
- Ueda, K., Komine, J., Matsuo, M., Seino, S. & Amachi, T. (1999a). Cooperative binding of ATP and MgADP in the sulphonylurea receptor is modulated by glibenclamide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 96, 1268-1272.
- Ueda, K., Matsuo, M., Tanabe, K., Morita, K., Kioka, N. & Amachi T. (1999b). Comparative aspects of the function and mechanism of SUR1 and MDR1 proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1461, 305-313.
- Usachev, Y. M., Marchenko, S. M. & Sage, S. O. (1995). Cytosolic calcium concentration in resting and stimulated endothelium of excised intact rat aorta. *Journal of Physiology* 489, 309-317.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M. J. & Gay, N. J. (1982). Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* 8, 945-951
- Yamada, M., Isomoto, S., Matsumoto, S., Kondo, C., Shindo, T., Horio, Y. & Kurachi, Y. (1997). Sulphonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulphonylurea-sensitive but ATP-insensitive channel. *Journal of Physiology* 499, 715-720.
- Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Seki, T. & Sperelakis, N. (1998). ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology* 274, C25-C37.

Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Seki, T. & Sperelakis, N. (1999). Antisense oligonucleotides of sulfonylurea receptors inhibit ATP-sensitive K⁺ channels in cultured neonatal rat ventricular cells. *Pflügers Archiv* 437, 400-408.

Eigene Veröffentlichungen

Langheinrich, U., Mederos y Schnitzler, M. & Daut, J. (1998). Ca²⁺ transients induced by K_{ATP}-channel opening in isolated coronary capillaries. *Pflügers Archiv* 435, 435-438.

Preisig-Müller, R., Mederos y Schnitzler, M., Derst, C. & Daut, J. (1999). Separation of cardiomyocytes and coronary endothelial cells for cell-specific RT-PCR. *American Journal of Physiology* 277, H413-H416.

Mederos y Schnitzler, M., Derst, C., Daut, J. & Preisig-Müller, R. (2000). ATP-sensitive potassium channels in capillaries isolated from guinea-pig heart. *Journal of Physiology* 525, 307-317

Mederos y Schnitzler, M., Langheinrich U. & Daut J. (1998). ATP-sensitive potassium channels in coronary capillaries isolated from guinea-pig heart. *Pflügers Archiv* 435 (Suppl.), R83.

Mederos y Schnitzler, M., Preisig-Müller, R. & Daut, J. (1999). ATP-sensitive potassium channels in isolated capillaries from guinea-pig heart: Electrophysiological and molecular characterization. *Basic Research in Cardiology* 94, 406.

Preisig-Müller, R., Mederos y Schnitzler, M., Derst, C. & Daut, J. (1999). K_{ATP} channels in guinea-pig heart: Which subunits are expressed in cardiomyocytes and coronary endothelial cells? *Pflügers Archiv* 437 (Suppl.), R85.

Preisig-Müller, R., Derst, C., Mederos y Schnitzler, M. & Daut, J. (1999). Expression of the Kir2.0 family and K_{ATP}-channels in cardiomyocytes and coronary endothelial cells. *The Physiologist* 42, A1.

Danksagung

Als erstes möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Daut meinen aufrichtigen Dank aussprechen für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Uwe Homberg danke ich für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und für die Teilnahme an seinen diskutierfreudigen Seminaren.

Dr. Hans-Georg Klieber danke ich für die Einführung in die Patch-Clamp-Technik und die damit verbundenen Diskussionen, Dr. Ulrike Langheinrich für die Diskussionen zur Kapillarpräparation, Dr. Michael Dittrich für die Einführung in die Perforated-Patch-Methode und Dr. Horst Schneider für das Programmieren der Datenaufnahme.

Besonders danke ich Dr. Regina Preisig-Müller für das Unter-die-Fittiche-nehmen an ihrem molekularbiologischen Praktikum.

Dr. Günter Schlichthörl danke ich herzlich für die prompte Bereitstellung seines Macintosh-Computers.

Vor allem danke ich Brigitte Burk für das erfolgreiche Assistieren und Roswitha Luzius für die vielen Kopierarbeiten und das Spülen.

Außerdem gilt mein großer Dank Robert Graf und Kersten Schneider aus der feinmechanischen Werkstatt, die mich bei technischen Problemen stets unterstützt haben.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Andrea Schubert, Anette Hennighausen, Dr. Christian Derst, Erich Reisinger, Erika Hoffmann, Dr. Gongxin Liu, Jan Gerhardus, John Ray, Lothar Krapp, Dr. Peter Hanley, Dr. Roman Wölfel, Sindhu Rajan, Susanne Bamerny, Tanja Haase, Thomas Schüler und Zhao Ying danke ich für das harmonische Miteinander im Labor.

Nicht zuletzt danke ich all meinen Freunden, die für mein seelisches und leibliches Wohl gesorgt, mich moralisch unterstützt haben und mir hilfreich zur Seite standen, ganz besonders mi cariño Sabine, die außerdem diese Arbeit korrigiert hat.